

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. Jonat)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**Evaluation der klinischen Praktikabilität und prognostischen Aussage-  
fähigkeit der intraoperativen Sentinellymphknotendiagnostik mittels  
One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) bei invasivem Mamma-  
karzinom**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Hofmann, Jakob**  
aus Alsfeld

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christian Schem  
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Carsten Maik Naumann  
  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014  
  
Zum Druck genehmigt,  
  
Kiel, den 01.04.2014  
  
Gez. Prof. Dr. Johann Roider

Meinen Eltern in Liebe gewidmet

---

**Abkürzungsverzeichnis**

ALND	Axilladisektion
AUC	Area under the curve
cDNA	komplementär DNA
CA	Karzinom
CIS	Carzinoma in situ
CK	Cytokeratin
CoAP	College of American Pathologists
DAB	Di-Amino-Benzidin
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
H&E	Hämatoxylin und Eosin
LAMP	Loop- mediated- isothermal amplification
LN	Lymphknoten
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-Technischer Assistent
OSNA	One-step Nucleic Acid amplification
RNA	Ribonukleinsäure
RT- LAMP	Reverse transcriptase-LAMP
SLN	Sentinellymphknoten
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig- Holsten
WHO	World Health Organisation

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren .....	1
1.2	Diagnostik und Staging .....	1
1.3	Therapeutisches Vorgehen und Sentinelmethode .....	2
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>5</b>
2.1	Patienten und Lymphknoten .....	5
2.2	Studiendesign .....	5
2.3	Sentinel-Lymphonodektomie (SLND) .....	7
2.4	One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) .....	7
2.4.1	Prinzip der Vermehrung der mRNA und Quantifizierung .....	7
2.4.2	Entwicklung des Assay.....	8
2.4.3	Aufarbeitung des LN und Durchführung von OSNA.....	10
2.5	Hämatoxylin und Eosin- (H&E)-Färbung .....	11
2.6	Immunhistochemie nach CK19 .....	12
2.7	Mikroskopische Auswertung.....	12
2.8	Statistik .....	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>14</b>
3.1	Beschreibende Statistik der erhobenen Patientendaten .....	14
3.1.1	Patientenalter und Menopausenstatus.....	14
3.1.2	Tumor-Stadium, Tumorgöße und Resektionsstatus .....	15
3.1.3	Tumorart, Lymphinvasion, Gefäßinvasion.....	15
3.1.4	Ergebnisse der Hormonrezeptoranalysen .....	16
3.1.5	Ergebnisse der Lymphknotendiagnostik .....	17
3.1.6	Postoperative medikamentöse Therapie .....	18
3.2	Statistische Korrelationen zwischen Prognostischen Faktoren und den OSNA- Ergebnissen .....	20
3.2.1	Tumorgöße vs. OSNA-Ergebnis .....	20
3.2.2	OSNA vs. Non- SLN-Positivität .....	20
3.2.3	Anzahl der positiven SLNs vs. Non- SLN Positivität .....	24
3.2.4	Zusammenfassung der Korrelationen zwischen OSNA und den prognostischen Faktoren.....	25
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>26</b>
4.1	Diskussion der angewandten Methoden .....	26
4.2	Diskussion der statistischen Ergebnisse .....	29
4.3	Ausblick.....	31
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>34</b>

---

<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>35</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	35
6.2	Tabellenverzeichnis .....	35
6.3	Chemotherapieprotokolle: .....	37
6.3.1	FEC .....	37
6.3.2	FEC gefolgt von Docetaxel .....	38
6.3.3	TAC .....	39
6.4	TNM- Klassifikation .....	40
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>49</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist das bei weitem häufigste bösartige Tumorgeschehen der Frau. Im Jahr 2008 war es für 1,38 Millionen Neuerkrankungen weltweit verantwortlich. Dies entspricht einem Prozentsatz von 23% bezogen auf die Anzahl der bösartigen Erkrankungen bei Frauen. Im Jahr 2008 lag die Zahl der Todesfälle aufgrund eines Mammakarzinoms weltweit bei 458.400. Damit sind 14% der malignomassoziierten Todesfälle auf das Mammakarzinom zurückzuführen [1]. In Deutschland erkrankten 2008 laut Robert-Koch-Institut ca. 72.180 Patienten an Brustkrebs. Im Mittel waren die erkrankten Frauen 65 Jahre alt. Die 5-Jahresüberlebensrate nach Erstdiagnose lag zwischen 83% und 87% [2]. Die epidemiologischen Zahlen zeigen, welch hohen Stellenwert diese Erkrankung in unserem Gesundheitssystem einnimmt und wie wichtig es ist, neue Verfahren für Früherkennung, Staging und Therapie zu etablieren.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des Mammakarzinoms zählen das Alter der Menarche, das Alter der Erstgravidität, die Familienanamnese für Brustkrebs eines nahen Verwandten [3], eine Mutation im BRCA1/2 Gen [4] sowie veränderbare Lebensgewohnheiten, wie Alkoholkonsum und Ernährungsgewohnheiten mit dem daraus folgenden Body-Mass-Index(BMI) [5].

## 1.2 Diagnostik und Staging

Generell stehen zur Diagnose bzw. Diagnosesicherung verschiedene invasive bzw. nicht-invasive Methoden zur Verfügung. Mit der Mammographie, die zum Screening bei Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr von der „World Health Organisation“ (WHO) empfohlen wird, kann ein tumorverdächtiger Bezirk bereits früh erkannt werden. Außerdem existieren laut den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft aus dem Jahr 2008 [6] als weitere Diagnosemöglichkeiten die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittelgabe und die Mamasonografie mit Hochfrequenzsonden (7,5-10 MHz) [7]. Weitere interventionelle Diagnosemethoden sind die Stanz- und Vakuumbiopsie sowie die Feinnadelbiopsie von axillären Lymphknoten. Anhand des biopsierten Materials kann pathologisch die Art des Tumors, Malignitätsgrad und die eventuelle Expression hormonspezifischer Rezeptoren sowie des HER2neu-Rezeptors ermittelt werden. Zudem besteht Sicherheit, ob es sich um ein malignes Geschehen handelt. Nach definitiver Diagnosestellung erfolgt das Staging. Die Leitlinien der

Deutschen Krebsgesellschaft sehen eine Röntgen-Thorax-Untersuchung, eine Oberbauchsonografie und eine Skelettszintigraphie vor [6]. Die Untersuchungen dienen der Suche nach Fernmetastasen.

### 1.3 Therapeutisches Vorgehen und Sentinelmethode

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem invasiven Mammakarzinom, sodass auf die Beschreibung der Therapie von nicht-invasiven Karzinomen im hiesigen Kontext verzichtet wird. Diagnostiziert der Pathologe ein invasives Karzinom, so gilt die brusterhaltende R0 Resektion (mehr als 1mm Abstand zum Resektionsrand) als erste Standardtherapieform [6]. Zusätzlich wird postoperativ nach brusterhaltender Operation eine adjuvante Strahlentherapie der operierten Brust empfohlen. Auf eine komplette Mastektomie wird laut Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.“ (DGGG) aus dem Jahr 2008 erst zurückgegriffen, wenn der Tumor selbst bei Resektion nicht komplett entfernt werden konnte, diffuse ausgeprägte Kalzifikationen von maligner Art vorliegen, eine Bestrahlung nach brusterhaltender Operation kontraindiziert oder der Tumor multizentrisch verteilt ist [6]. Studien haben gezeigt, dass beide Operationsverfahren im Hinblick auf die Prognose gleichwertig sind [8, 9]. Ziel ist es, nach komplettem chirurgischem Eingriff, dem bereits durchgeführten Staging und der pathologischen Begutachtung aller Operationspräparate eine komplette TNM-Klassifikation vornehmen zu können. Laut dem „College of American Pathologists“ (CoAP) gilt die TNM-Klassifikation als klassischer Prognosefaktor. Zudem ist die Tumorgöße ein wichtiger prognostischer Faktor im Hinblick auf eine eventuelle Lymphknotenmetastasierung. Das CoAP gibt die Wahrscheinlichkeit für ein krankheitsfreies Intervall von 10 Jahren bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und einem Tumor kleiner als 1cm mit 90% an. Nur 20 bis 30% der nodalnegativen Patienten entwickeln innerhalb von 10 Jahren ein Rezidiv. Im Vergleich dazu entwickeln 70% der Nodalpositiven ein Rezidiv [10]. Diese Zahlen machen deutlich, wie wichtig die Angabe des korrekten Nodalstatus ist.

Das Problem beim Bestimmen des korrekten Nodalstatus liegt darin, dass es immer eine komplette Axilladisektion (ALND) notwendig macht. Hierbei wird die Axilla eröffnet und es werden 10 Lymphknoten aus Level I und II entnommen und analysiert [11]. Dieses Vorgehen hat jedoch mit verminderter Bewegungsfreiheit des Armes, Schmerz und sensitiven Ausfällen im operierten Bezirk deutliche postoperative Nebenwirkungen [12]. Somit sollte die Indikation zur ALND streng gestellt werden.

Das Aufsuchen des sogenannten Sentinellymphknotens (SLN) hat sich hierbei als Standardverfahren behauptet, um die Rate an ALND und damit auch der Nebenwirkung zu senken



---

[13]. Es beruht auf der Annahme, dass solide Malignome lymphatisch entlang eines bestimmten Drainageweges drainieren. Der Begriff SLN oder auch Wächterknoten bezeichnet den in dem Drainageweg ersten zwischengeschalteten Lymphknoten (LN). Somit lässt der Metastasierungsgrad des SLN eine Aussage über die Metastasierung der nachgeschalteten Lymphknotenstationen zu [13].

Da die radikale Axilladisektion mit erheblichen Morbiditäten im operierten Bereich vergesellschaftet ist, gibt uns die SLN-Biopsie die Möglichkeit, den Grad der lymphogenen Metastasierung einzuschätzen. So kann im Falle von SLN-Negativität auf die ALND verzichtet werden. Additiv weisen die Patientinnen nach Sentinellymphknotenbiopsie eine erhöhte Lebensqualität auf [14, 15].

Zum Auffinden des SLN werden radioaktives  $^{99m}\text{Tc}$  und Methylenblau präoperativ in den Bereich des Mammakarzinoms gespritzt. Der SLN kann dann mit Hilfe einer Gamma-sonde sowie nach Eröffnen der Sentinelregion auch makroskopisch aufgefunden werden. Der oder die markierten SLN werden nach Entnahme intraoperativ von einem Pathologen oder wie in der vorliegenden Studie von dem Gerät „RD100i“ der Firma Sysmex, Japan mittels One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) analysiert. Auf Grundlage des histologischen bzw. molekularen Ergebnisses wird eine ALND durchgeführt. Das Verfahren bietet den großen Vorteil, dass in vielen Fällen auf die Fortführung der Operation verzichtet werden kann. Jedoch lässt die bisherige Studienlage die Indikationsstellung nur bei T1 und T2-Tumoren zu [16, 17].

Von dem Ergebnis der SLN-Biopsie bzw. von dem Ergebnis der ALND im Fall von SLN-Positivität hängt das weitere Vorgehen im Hinblick auf eine systemische Therapie ab. Je nach Befund werden eine endokrine Therapie, eine Antikörper- oder Chemotherapie bzw. eine Kombinationstherapie durchgeführt. Am Primärtumor wird immunhistochemisch durch den Pathologen überprüft, ob das Tumorgewebe Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren exprimiert oder Her2neu positiv ist [18].

Bei Hormonrezeptorexpression wird eine endokrine Therapie empfohlen. Diese wird bei prämenopausalen Patientinnen durch Ausschalten der Ovarialfunktion sowie Tamoxifen und bei postmenopausalen Patientinnen mit einem Aromatasehemmstoff durchgeführt [19, 20]. Im Falle von Her2neu-Positivität initiiert man eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Diese Therapie hat sich im Hinblick auf die Langzeitprognose als effektiv erwiesen [21]. Sind alle drei Parameter negativ, bleibt als letzte Option die Chemotherapie.

---

Diese hat in Kombination mit der systemischen Antikörpertherapie und der endokrinen Therapie, aber auch alleine eine deutliche Reduktion der Mortalitätsrate zur Folge jedoch verbunden mit erheblichen Nebenwirkungen [20].

Die Entscheidung über das weitere adjuvante therapeutische Vorgehen wird anhand verschiedener interdisziplinärer Parameter getroffen. Hierzu zählen: Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Her2neu-Status, Menopausenstatus, Alter sowie der histologische Tumortyp [22] und der intrinsische Subtyp [23].

Die vorliegende Studie beschäftigt sich genauer mit der Analyse des SLN. Von diesem Ergebnis hing lange ab, ob eine ALND vorgenommen wird. Jedoch wird nach neuerer Studienlage eine sofortige Axilladisektion nach positiven Sentinelbefund kritisch gesehen [24]. Während der Nodalstatus lange Zeit als wichtiges Entscheidungskriterium für oder gegen eine systemische Chemotherapie galt [25], wurde er mittlerweile durch weitere Parameter ergänzt. Dabei ist die Bestimmung des intrinsischen Subtyps weiter in den Vordergrund gerückt [23]. Trotz allem spielt der Nodalstatus weiterhin eine wichtige Rolle, zur Festlegung auf eine postoperative Therapie. So wird laut der St.-Gallen-Konferenz aus dem Jahr 2011 eine adjuvante Chemotherapie ab mindestens drei positiven LN grundsätzlich empfohlen [23]. Dies zeigt den weiterhin bestehenden hohen Stellenwert des Nodalstatus bei der Therapieplanung. Der therapeutische Effekt der Axilladisektion wird zudem gegenwärtig durch die INSEMA-Studie multizentrisch untersucht.

Nachdem eine Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) nachweisen konnte, dass die One-step Nucleic Amplification (OSNA) ein valides Verfahren zur Bestimmung des SLN-Status darstellt [26], soll die vorliegende Studie nun die klinische Praktikabilität sowie die prognostische Aussagefähigkeit von OSNA untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Lymphknoten

Die vorliegende Studie untersuchte intraoperativ 330 SLNs von 143 Brustkrebspatientinnen, was einen Durchschnitt von 2,3 SLNs pro Patientin entspricht.

Die Patientinnen befanden sich alle in Behandlung am Mammazentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) und wurden im Zeitraum vom 11.07.2008 bis zum 22.01.2010 operiert. Alle Patientinnen willigten ein an der Studie teilzunehmen. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität Kiel genehmigt.

Es wurden nur stanzbioptisch histologisch gesicherte invasive Brustkrebspatientinnen zur Studie zugelassen. Neoadjuvant behandelte Patientinnen wurden ausgeschlossen. Das Staging wurde nach der gültigen TNM-Klassifikation (siehe 6.4) durchgeführt. Die Patientinnen wurden im weiteren Verlauf gemäß den bestehenden Leitlinien [6] therapiert.

### 2.2 Studiendesign

Die Präparation der SLNs und die OSNA-Analyse wurden intraoperativ in einem Labor im Operationsbereich durchgeführt, ohne dass dabei ein Pathologe involviert war. Nach Präparation und Entnahme des LN durch den Operateur befreite ein Medizinisch-Technischer Assistent (MTA) diesen von Fettgewebe und entfernte mit Hilfe eines speziellen Cutters eine 1mm breite Scheibe aus dem Zentrum des LN. Bei mehr als für das Gerät kompatiblen vier SLNs mussten die überschüssigen LNs postoperativ histologisch begutachtet werden.

Im Falle eines positiven OSNA-Ergebnisses (Einstufung der OSNA-Ergebnisse anhand der von OSNA gefundenen Cytokeratin19 (CK19) mRNA-Kopien (siehe 2.4.2)) wurde eine ALND während der gleichen Narkose durchgeführt. Additiv wurde die 1mm breite Scheibe aus dem Zentrum des SLNs postoperativ Haematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und histologisch begutachtet. Im Gegensatz dazu wurde das 1mm breite Stück bei OSNA-Negativität nochmals in 200µm breite Scheiben geteilt und in H&E-Färbung analysiert. (siehe *Abb.1*)

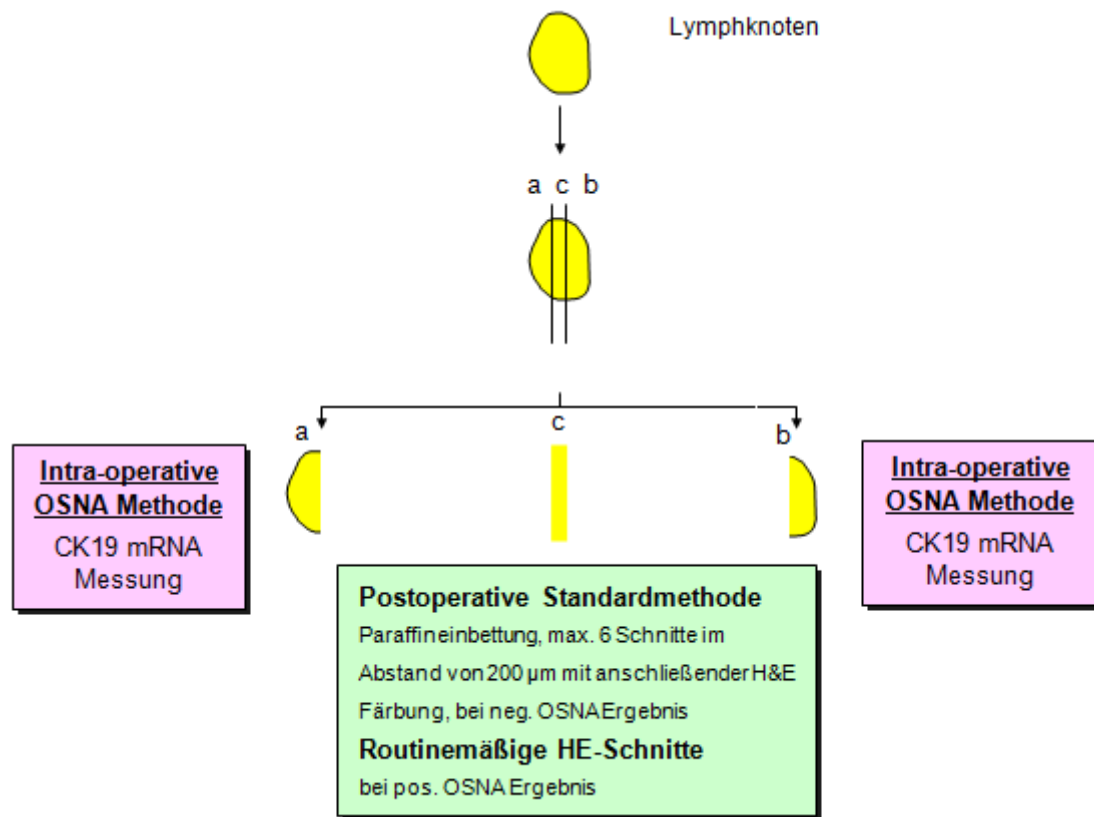


Abb.1 Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung

In einigen Fällen wurde eine Spezialfärbung nach CK19 durchgeführt, um das Ergebnis zu verifizieren. Im Falle einer positiven Histologie bei OSNA negativen SLNs musste eine Zweitoperation zur endgültigen ALND durchgeführt werden. Alle Non-SLNs wurden pathologisch untersucht.

Die benötigte Zeit nach Entfernung des SLN bis zum OSNA-Ergebnis wurde erfasst und statistisch ausgewertet.

Das Studienprotokoll zur statistischen Evaluation berücksichtigt weiterhin folgende Patientendaten und tumorspezifischen Eigenschaften: Alter, Menopausenstatus, Tumorart, Tumorgroße, Tumorstadium, Resektionstatus, Lymphinvasion, Fernmetastasierung, Anzahl der positiven LNs, der entfernten LNs gesamt und der positiven SLNs gesamt.

Weiterhin berücksichtigt wurden: Progesteron- und Östrogenrezeptorexpression, Her2neu-Positivität und das verwendete Chemotherapieprotokoll.

Leitliniengerecht wurde die Chemotherapie je nach Rezidivrisiko entweder durch die Dreiertherapie mit einem Antrazyclin (siehe 6.3.1) oder durch eine taxanhaltige Chemotherapie (siehe 6.3.2 oder 6.3.3) durchgeführt.

## 2.3 Sentinel-Lymphonodektomie (SLND)

Präoperativ werden die SLNs mit einem Radionuklid und mit einem Farbstoff markiert. Als Radionuklid wird Technetium-99m-nanocolloid und als Farbstoff Methylenblau verwendet. Es werden 1-2ml des Radionuklids peritumoral und 1-2ml des Farbstoffs subareolär injiziert. Sollte präoperativ klinisch und sonographisch kein auffälliger LN zu finden sein, wird jede Operation eines bioptisch gesicherten invasiven Mamma-CA mit einer SLND kombiniert. Es empfiehlt sich in diesem Fall, die SLND in einem primären Schritt durchzuführen, um in der Wartezeit auf das histologische Ergebnis, den Primärtumor operieren zu können.

Im ersten Schritt werden mit Hilfe einer Gammasonde die radioaktiv markierten LNs aufgesucht. Der Zugang erfolgt durch eine Hautinzision von ca. 2–3 cm Länge und idealerweise 1cm unter der Behaarungsgrenze lateral des Randes des Musculus pectoralis major. Im nächsten Schritt wird die Fascia axillaris gespalten und man präpariert sich atraumatisch durch den axillären Fettkörper in Richtung des erneut durch die Gammasonde aufgesuchten SLN. Nach Auffinden werden alle mit Farbstoff oder radioaktiv markierten SLNs entfernt. Die entnommenen LNs werden nochmal abseits des OP-Feldes mit der Sonde und auch optisch zur Sicherheit inspiziert. Alle speichernden LNs können als SLN klassifiziert werden. Anschließend werden alle palpatorisch und inspektorisch auffälligen LNs entfernt, weil SLNs mit ausgedehntem Tumorbefall häufig keine Marker speichern.

Zum Schluss wird die Axilla auf radioaktive Restaktivität untersucht. Im Falle von histologisch oder molekular diagnostizierten Lymphknotenmetastasen wird eine ALND durchgeführt. Andernfalls kann die Inzision verschlossen werden [27].

## 2.4 One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA)

### 2.4.1 Prinzip der Vermehrung der mRNA und Quantifizierung

Das „RD-100i“ der Firma Sysmex basiert auf dem Prinzip der „One-step Nucleic Acid Amplification“ (OSNA). Es handelt sich hierbei um ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung der mRNA-Expression des Tumormarkers CK19 im Tumorherd.

Dabei wird das Schema der „Loop mediated isothermal amplification“ (LAMP) angewendet. Es hat den Vorteil, dass es unter isothermen Bedingungen eine geringe Anzahl von DNA innerhalb einer Stunde auf  $10^9$  vermehren kann.

Das Schema beruht auf einer Versuchsanordnung mit mindestens vier Primern, die von außen und von innen an die DNA binden und dadurch diese ohne Temperaturänderung amplifizieren können. Somit ist zu Beginn keine Denaturierung notwendig [28]. Darüber hinaus ist die Pro-

zedur auch geeignet RNA-Ziele zu vervielfältigen. Man nennt diese Methode „Reverse Transcription-LAMP“ (RT-LAMP). Hierbei wird die vorliegende mRNA durch eine „Reverse Transcriptase“ in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann mittels LAMP vermehrt und detektiert werden kann [29]. Die Anzahl der gebildeten Kopien wird mit Hilfe von Metallionen im Konzentrat bestimmt. Während der Polymerisierung von Nukleinsäuren entstehen in hohem Maße Pyrophosphationen, die mit Metallionen unlösliche Komplexe bilden. Dies führt dazu, dass die Konzentration der freien Metallionen signifikant fällt. Calcein ist ein metallischer Indikator, der bei Komplexbildung mit zweiwertigen Eisenionen wie Magnesium starke fluoreszierende Signale hervorbringt. Allerdings reicht Calcein als alleiniger Indikator nicht aus, um eine detektierbare photometrische Veränderung hervorzurufen. Nutzt man es jedoch im Komplex mit zweiwertigen Manganionen, kann Mangan aus der Bindung mit Calcein entlassen werden und mit Pyrophosphationen Komplexe bilden. Dadurch wird die Bindungsstelle des Calceins frei und kann durch Magnesium besetzt werden. Unter Einstrahlung von ultraviolettem Licht fluoresziert der Komplex. Die Abwesenheit von freiem Magnesium terminiert die Reaktion (siehe Abb. 2) [30].

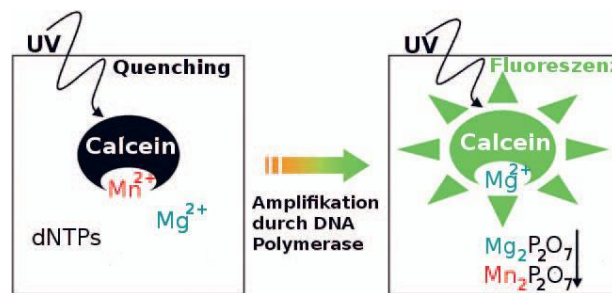


Abb. 2 Prinzip der Fluoreszenz von Calcein während der Vervielfältigung mittels LAMP (Abbildung aus Tomita et al., 2008 [30])

Mit Licht der Wellenlänge 465nm wird nun die Farbänderung photometrisch detektiert.

#### 2.4.2 Entwicklung des Assay

Der vorliegende Verfahren OSNA wurde von Tsujimoto et al. im Jahr 2007 etabliert und im Fachjournal „Clinical Cancer Research“ publiziert. Bei der Etablierung wurden zunächst 45 mRNA Marker untersucht, die als spezifisch für Brustkrebs gelten [31]. Die Expression dieser Marker wurde durch die „Quantitative Reverse Transcription-PCR“ (QRT-PCR) ermittelt. Dabei wurden jeweils vier histopathologisch positive LNs mit vier histopathologisch negativen LNs verglichen. Bei ausgewählten Markern, unter anderem auch CK19, wurden elf histopathologisch positive LNs und 15 histopathologisch negative LNs von 26 Patientinnen untersucht. Das Level der Expression unterschied sich in positiven und negativen LNs signifikant

bei den Markern „forkhead box A1 (FOXA1)“, „SAM-pointed domain containing ETS transcription factor (SPDEF)“ und CK19. Dieses stellte sich als geeigneter Marker heraus, da die Expression von den anderen beiden Markern bei histopathologisch positiven LNs vier bis 30 fach geringer war.

Die Technik nutzt sechs verschiedene Primer für die RT-LAMP [31], da mit CK19a und CK19b zwei Pseudogene existieren [32, 33], die beim Polymerisieren mit nur vier Primern ebenfalls detektiert werden und somit falsch positive Ergebnisse möglich machen können. Die sechs Primer sind so konfiguriert, dass einzig CK19 hybridisiert und vervielfältigt wird [31].

Es besteht eine reziproke Korrelation zwischen Zeit und Anzahl der ermittelten CK19-Kopien in einer Probe bei An- und Abwesenheit eines histopathologisch negativen LN-Lysates. Beide Kurven liegen direkt übereinander. Dies impliziert, dass andere Faktoren, die in einem LN-Lysat vorliegen nicht mit dem Ergebnis von OSNA interferieren [31]. Um die Amplifikation von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) auszuschließen, wurde diese aus metastasierten und nicht metastasierten LNs extrahiert und via OSNA untersucht. In beiden Fällen konnte keine CK19 mRNA amplifiziert werden [31].

Um die Einteilungsgrenzen zwischen „nicht metastasiert“ und „metastasiert“ festzulegen, wurden zunächst 42 LNs von pN0 klassifizierten Brustkrebspatientinnen untersucht. Der Durchschnittswert der CK19 mRNA Expression lag bei  $2,5 \cdot 10^2$  Kopien/ $\mu$ l. Die Arbeitsgruppe legte die Obergrenze für histopathologisch negative LNs deshalb auf diesen Wert fest. Zudem wurde dieses Ergebnis nochmals anhand von 42 histopathologisch negativen LNs von 16 pN1-3 eingestuften Patientinnen bestätigt. Um zwischen Makrometastase (++) und Mikrometastase (+) zu unterscheiden, wurde der Schwellenwert auf  $5 \cdot 10^3$  Kopien/ $\mu$ l festgelegt, da dies der niedrigste Wert war, der bei einem Lymphknoten mit einer histopathologisch gesicherten Metastase von  $>8 \text{ mm}^3$  gefunden wurde [31]. Aufgrund dieser Ergebnisse werden die LNs von dem Gerät OSNA wie folgt klassifiziert.

$<2,5 \cdot 10^2$ Kopien/ $\mu$ l	keine Metastase (-)
$2,5 \cdot 10^2$ Kopien/ $\mu$ l – $5,0 \cdot 10^3$ Kopien/ $\mu$ l	Mikrometastase (+)
$>5,0 \cdot 10^3$ Kopien/ $\mu$ l	Makrometastase (++)

Es können insgesamt vier LNs gleichzeitig analysiert werden.



Abb. 3 RD-100i, Quelle: [www.sysmex.com.br/01-11-07.htm](http://www.sysmex.com.br/01-11-07.htm)

### 2.4.3 Aufarbeitung des LN und Durchführung von OSNA

Der mittels Gammasonde detektierte LN wurde durch den operierenden Gynäkologen präpariert und entnommen. Nach Einfrieren des LN wurde mit Hilfe eines speziellen Cutters (siehe Abb. 4) der Firma Sysmex, Japan ein 1mm breites Stück aus dem Zentrum des LN entfernt. Dieses wurde zur permanenten Histologie fixiert. Alle folgenden Schritte wurden ohne ärztliche Beteiligung durchgeführt.

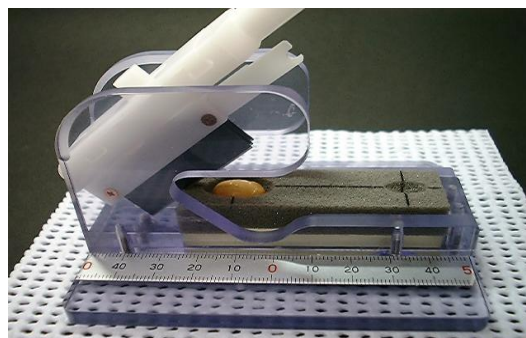


Abb. 4 Cutter

Nach Ankunft des restlichen LN-Gewebes beim MTA wurde der LN von Fettgewebe befreit und anschließend gewogen. Da das Gerät nur für ein LN Gewicht von 600mg ausgelegt ist, wurde der SLN im Falle eines höheren Gewichts nochmals geteilt.



Im nächsten Schritt wurde das überbleibende SLN Gewebe in 4ml der Pufferlösung Lynorhag® pH 3,5 (Sysmex, Japan) auf Eis homogenisiert (90s, bei 25000rpm) und 1ml wurde entnommen. Dieser wurde bei  $10.000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$  für 60s zentrifugiert. Aus dem zentrifugierten Lysat wurden 20µl zur Analyse mittels OSNA entnommen und in einem Probenröhrchen mit 180 µl Lynorhag® vermischt. Im Anschluss wurden aus diesem Lysat 20µl entfernt und mit 180µl Lynorhag® vermengt. Die erste Lösung wurde für die normale, die zweite für die verdünnte Analyse verwendet. (siehe Abb. 5)

Der Rest des Lysats wurde für eventuelle weitere Untersuchungen oder Kontrollen bei minus 80°C eingefroren.

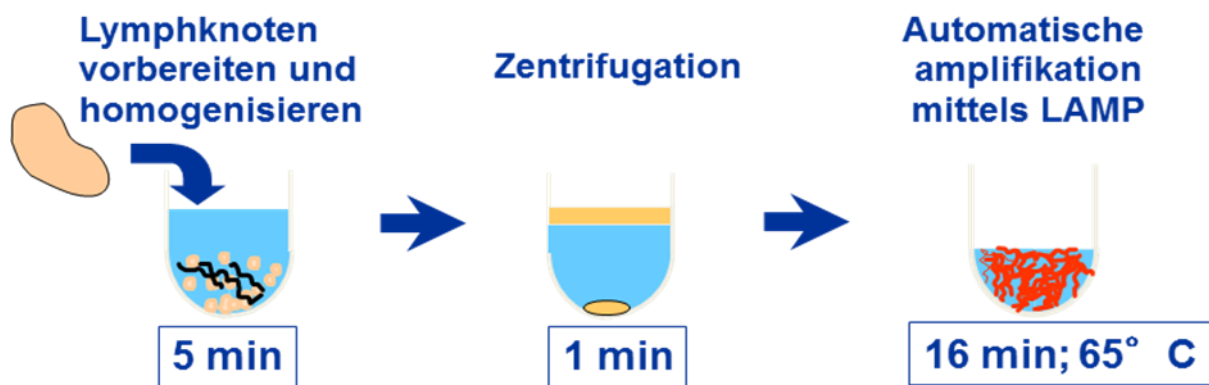


Abb. 5 Lymphknotenaufarbeitung

Eine positive und eine negative CK 19 mRNA Kontrollprobe, welche im Lyoamp Reagent Kit® (Sysmex, Japan) zur Verfügung gestellt werden, wurden bei jedem Analyselauf durchgeführt.

## 2.5 Hämatoxylin und Eosin- (H&E)-Färbung

Die H&E-Färbung ist eine histologische Standardfärbung zur Darstellung von Zellverbänden unter dem Mikroskop. Die gängigen Leitlinien besagen, dass für die pathologische Begutachtung der SLNs bei Brustkrebs eine H&E-Färbung ausreicht [6].

Alle H&E-Färbungen wurden mit dem Gerät Varistain (Thermo Shandon, USA) durchgeführt und von einem Pathologen nach der gängigen TNM-Klassifikation (siehe 6.4) begutachtet.

## 2.6 Immunhistochemie nach CK19

Alle immunhistochemischen Färbungen nach CK19 wurden per Hand durchgeführt. Nach Entparaffinierung (2\* 10 min in Xylol) und wässern der Schnitte (2\* Xylol+100% Ethanol, 2\* 100% Ethanol, 2\*96% Ethanol) folgte das Blocken der zelleigenen endogenen Peroxidase für 15 min in 250ml Ethanol und 5ml Wasserstoffperoxid. Danach wurde das Präparat, das in die absteigende Alkoholreihe (1\* 96% Ethanol, 2\* 70% Ethanol) zurückgeführt wurde, mit destilliertem Wasser gespült. Nach der Demaskierung des Antigens mit der Protease P5147 (Firma. Sigma, Deutschland) für 5min im 37°C Wasserbad und erneutem Spülen mit Aqua destillata wurde das Präparat in den Waschpuffer überführt. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper Keratin, Pan Ab-1 (Firma. Thermo Fisher Scientific, Großbritannien) in 1:200 Verdünnung für 30 min bei Raumtemperatur gefolgt von dreimaligem Spülen mit dem Waschpuffer. Das Präparat wurde mit dem Polymer „Histofine Simple Stain Max Po Polymerasesystem“ (Firma. Nichirei, Japan) inkubiert.

Im Folgeschritt wurde es dreimal mit Waschpuffer gespült. Danach wurde die Di-Amino-Benzidin- (DAB) Entwicklung in 1ml Aqua destillata gemischt mit 20µl Puffer, 20µl DAB (Peroxidase DAB Substratkit, Firma. Vector, USA) und 20µl Hydrogenperoxidase für 5min durchgeführt. Es folgte gründliches Spülen mit Leitungswasser und einmalig mit Aqua destillata. Zur Kerngegenfärbung wurde Hämalun (1:2 verdünnt mit Aqua destillata für eine Minute) verwendet, bevor erneut mit Leitungswasser gespült wurde. Als letzter Schritt wurde das Präparat in eine aufsteigende Alkoholreihe (2\* 70% Ethanol, 2\* 96% Ethanol, 2\* 100% Ethanol, 2\* 100% Ethanol+Xylol und 4\* Xylol) überführt und mit Pertex eingedeckt.

## 2.7 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der angefertigten Schnitte wurde leitliniengerecht in H&E-Färbung realisiert. LNs mit isolierten Tumorzellen wurden als negativ klassifiziert. Hierunter versteht man LNs, die nur einzelne Tumorzellen oder Cluster von Tumorzellen, die nicht größer als 0,2mm sind, aufweisen [34]. Als Mikrometastasen wurden Metastasen bezeichnet, die kleiner als 0,2cm in größter Ausdehnung waren. Alle weiteren Metastasen wurden als Makrometastasen klassifiziert.

---

## 2.8 Statistik

In der angewandten Statistik wurden die quantitativen Werte als Standardabweichung, mittlere Abweichung, Maximum, Minimum sowie mit Perzentilen dargestellt. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Normalverteilungen der untersuchten Zusammenhänge berechnet. Bei kleinen Fallzahlen wurde der Shapiro-Wilk-Test benutzt. Aufgrund von signifikanten Abweichungen wurden zwei unabhängige Muster mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Werte, die ordinal und nominal skaliert waren, wurden in absoluten und prozentualen Häufigkeiten dargestellt. Zwei der jeweiligen Werte wurden verglichen und auf statistische Abhängigkeit mit Hilfe des Chi-Square-Tests geprüft. Stellten sich die erwarteten Häufigkeiten als zu gering heraus, wurde der Fisher-Test hinzugezogen. Weiterhin wurde der ROC-Test ausgewählt, um eine CK19-mRNA Kopienanzahl zu bestimmen, die einen Schwellenwert definiert, der mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität die Wahrscheinlichkeit für eine non-SLN Metastasierung angibt. Bei allen Tests handelt es sich um zweiseitige Hypothesenprüfungen bei einem 5%igen Signifikanzniveau. Die statistischen Berechnungen wurden ausnahmslos mit PASW 18 (SPSS Inc., IBM, Chicago, IL) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibende Statistik der erhobenen Patientendaten

##### 3.1.1 Patientenalter und Menopausenstatus

Das Patientenalter der 143 Patientinnen lag im Mittel bei 60,94 Jahren mit einem Minimum von 26 Jahren und einem Maximum von 87 Jahren. Die Standardabweichung lag bei 11,96. 106 Patientinnen befanden sich in der Postmenopause. Dies entspricht einem Prozentsatz von 74,1%. 32 Patientinnen (22,4%) befanden sich noch in der prämenopausalen Phase (22,4%) und fünf (3,5%) waren perimenopausal.

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
<b>Alter [Jahre]</b>	143	60,94	11,960	26	87	52,00	61,00	71,00

*Tabelle 1 Patientenalter: Tabelle mit N, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Perzentilen*

Menopausenstatus	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
<b>prämenopausal</b>	32	22,4	22,4
<b>postmenopausal</b>	106	74,1	96,5
<b>perimenopausal</b>	5	3,5	100,0
<b>Gesamt</b>	143	100,0	

*Tabelle 2 Menopausenstatus: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente*

### 3.1.2 Tumor-Stadium, Tumorgröße und Resektionsstatus

Der größte Anteil des postoperativ durch den Pathologen bestimmten pT-Stadiums fiel auf das Stadium 1c, was einer Größe zwischen 1-2 cm entspricht (45,5%). Zwei Patientinnen hatten histologisch ein Carcinoma in situ und wurden deshalb aus den späteren korrelativen Berechnungen herausgenommen. Sechs Patientinnen wiesen eine Größe von mehr als 5 cm in längster Ausdehnung auf (4,2%). Dies entspricht dem Stadium pT3. Die mittlere Tumorgröße im Patientenkollektiv entsprach 1,736 cm mit einer Standardabweichung von 1.29. Das Minimum lag bei 0,2 cm und das Maximum bei 8 cm.

Tumorstadium	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
pTis	2	1,4	1,4
pT1a	4	2,8	4,2
pT1b	37	25,9	30,1
pT1c	65	45,5	75,5
pT2	29	20,3	95,8
pT3	6	4,2	100,0
<b>Gesamt</b>	<b>143</b>	<b>100,0</b>	

*Tabelle 3 Tumorstadium [pT]: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent ,wie auch die kumulierten Prozente*

139 Patientinnen konnten R0 reseziert werden (97,2%).

Zur Zeit der Operation lagen keine Fernmetastasen vor.

### 3.1.3 Tumorart, Lymphinvasion, Gefäßinvasion

101 (70,6%) der Patientinnen hatten ein invasiv duktales Karzinom. Ein invasiv lobuläres Karzinom wiesen 35 Patientinnen auf (24,5%). Die restlichen sieben Patientinnen hatten ein anders klassifiziertes Karzinom (4,9%).

<b>Tumorart</b>	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozent</b>	<b>Kumulierte Prozente</b>
<b>invasiv duktal</b>	101	70,6	70,6
<b>invasiv lobulär</b>	35	24,5	95,1
<b>pTis</b>	2	1,4	96,5
<b>invasiv mucinös</b>	1	,7	97,2
<b>invasiv apokrin</b>	1	,7	97,9
<b>medulär</b>	1	,7	98,6
<b>invasiv tubulär</b>	1	,7	99,3
<b>basaloid</b>	1	,7	100,0
<b>Gesamt</b>	143	100,0	

*Tabelle 4 Tumorart: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente*

Bei acht der 143 (5,6%) Patientinnen konnte eine Lymphinvasion festgestellt werden.

Eine Patientin hatte eine Gefäßinvasion (0,7%).

### 3.1.4 Ergebnisse der Hormonrezeptoranalysen

Postoperativ wurde bei allen Patientinnen untersucht, ob der Primärtumor Progesteron- bzw. Östrogenrezeptoren exprimiert. Im Mittel ergaben sich eine Expression des Östrogenrezeptors von 8,70 mit einer Standardabweichung von 3,74 und eine Expression des Progesteronrezeptors von 6,24 bei einer Standardabweichung von 4,196.

Auch der HER2neu-Status wurde bei allen Frauen untersucht. Im Ergebnis hatten sechs Patientinnen (4,2%) einen positiven Befund.

### 3.1.5 Ergebnisse der Lymphknotendiagnostik

In der vorliegenden Statistik wurden die Anzahl der mittels OSNA analysierten SLNs und die Anzahl der entfernten SLNs gesamt notiert. Gleiches erfolgte für die gesamte Anzahl der positiven LNs und die gesamte Anzahl der entfernten LNs. Bei sieben Patientinnen überstieg die Anzahl der intraoperativ entfernten SLNs die Kapazitäten von OSNA, sodass die überzähligen SLNs pathologisch begutachtet werden mussten. Sechs Mal wurden fünf SLNs entfernt und einmal acht.

Während der intraoperativen OSNA-Analyse hatten 104 (inklusive der zwei Fälle mit Carcinoma in situ) Patientinnen einen negativen Befund via OSNA und 39 einen positiven. Diese Ergebnisse wurden durch die permanente Histologie der zentralen 1mm breiten Scheibe aus dem SLN pathologisch validiert. 28 SLNs waren OSNA positiv und histologisch negativ. Bei zwei Patientinnen war der histologische Befund positiv und OSNA negativ. Im Mittel wurden 2,51 SLNs pro Patientin analysiert. Mittels OSNA wurden im Schnitt 2,28 SLNs detektiert.

LN-Anzahl	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
1	35	24,5	24,5
2	54	37,8	62,2
3	32	22,4	84,6
4	22	15,4	100,0
<b>Gesamt</b>	143	100,0	

*Tabelle 5 Anzahl der mit OSNA analysiert LNs: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente*

Der Mittelwert der positiven LN lag bei 0,55. Die im Durchschnitt pro Patientin analysierte LN-Anzahl lag bei 7,69.

### 3.1.6 Postoperative medikamentöse Therapie

Als postoperative Therapieoptionen kamen Hormontherapie, Antikörpertherapie und Chemotherapie zum Einsatz. 22 Patientinnen (15,4%) wurde keine Hormontherapie verordnet, während 30 Patientinnen (21%) mit Tamoxifen und 91 (63,6%) mit einem Aromatasehemmer behandelt wurden.

Endokrine Therapie	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
keine	22	15,4	15,4
Tamoxifen	30	21,0	36,4
Aromataseinhibitor	91	63,6	100,0
Gesamt	143	100,0	

*Tabelle 6 Endokrine Therapie: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente*

Die Entscheidung zur Einleitung einer Chemotherapie wurde vom interdisziplinären Tumorboard anhand der erhobenen Patientendaten getroffen. Bei 98 Patientinnen wurde keine weitere antiproliferative Therapie empfohlen. 32 Frauen wurden nach Schema 1 (siehe 6.3.1) und 22 nach Schema 2 oder 3 (siehe 6.3.2 oder 6.3.3) behandelt.

Chemotherapie	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
keine	89	62,2	62,2
Anthracyclin	32	22,4	84,6
Taxane	22	15,4	100,0
Gesamt	143	100,0	

*Tabelle 7 Chemotherapie: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente*



### 3.1.7 Analysezeiten von OSNA

Die Zeit von der Ankunft des SLNs beim MTA bis zur Beendigung des OSNA-Durchlaufs lag im Schnitt bei 34,4 min bei einem SLN bzw. 40,4 min bei zwei SLNs. Für vier LNs wurden im Durchschnitt 52,1min benötigt.

	1 SLN	2 SLN	3 SLN	4 SLN
<b>Spannbereich [min.]</b>	31-40	37-47	38-55	41-63
<b>Mittelwert</b>	34.4	40.4	46.9	52.1
<b>Standardabweichung</b>	2,5	2,3	4,3	4,2
<b>Variationskoeffizient</b>	7,3	5,7	9,1	8.0

*Tabelle 8 Benötigte Zeit für die OSNA-Analyse: bei der Gesamtzahl der mittels der Methode analysierten LN; angegeben sind der zeitliche Spannbereich, der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient*

## 3.2 Statistische Korrelationen zwischen Prognostischen Faktoren und den OSNA- Ergebnissen

### 3.2.1 Tumorgröße vs. OSNA-Ergebnis

Zwischen der Tumorgröße und dem OSNA Ergebnis konnte eine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden. Die Anzahl der Lymphknotenmetastasen war bei einem Primärtumor, der größer als 2cm war, signifikant erhöht. Der mittels Chi-Quadrat-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,038 und war somit statistisch signifikant.

		OSNA- Ergebnis			Gesamt	
Tumorgröße	bis 2cm	(-)	(+)	(++)		
		Anzahl	81	14	12	107
		% innerhalb von Tumorgröße	75,7%	13,1%	11,2%	100,0%
	% innerhalb von OSNA-Ergebnis	79,4%	82,4%	54,5%	75,9%	
	über 2cm	Anzahl	21	3	10	34
		% innerhalb von Tumorgröße	61,8%	8,8%	29,4%	100,0%
		% innerhalb von OSNA-Ergebnis	20,6%	17,6%	45,5%	24,1%
	Gesamt	Anzahl	102	17	22	141
		% innerhalb von Tumorgröße	72,3%	12,1%	15,6%	100,0%
% innerhalb von OSNA-Ergebnis		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Tabelle 9 Kreuztabelle OSNA-Ergebnis und Tumorgröße:  $p=0,038$ , angegeben ist der prozentuale Anteil der OSNA-Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Tumorgröße und die Prozentwerte der jeweiligen Tumorgröße innerhalb des OSNA-Ergebnisses.*

### 3.2.2 OSNA vs. Non- SLN-Positivität

Die Anzahl der CK19-Kopien, die von OSNA in (+) und (++) eingeteilt wird, ist ein prädiktiver Faktor für Non-SLN-Positivität. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen

diesen beiden Faktoren beobachtet werden. (Fisher's exact-test,  $p=0.011$ ). Bei einem doppelt positiven (++) OSNA-Ergebnis war die Wahrscheinlichkeit für eine Metastase in der Axilla im Vergleich zu einem einfach positiven (+) Ergebnis um das 13-fache erhöht. (Odds ratio,  $OR=13.3$ ,  $95\%-CI=[1.5; 118.9]$ )

		Non-SLN-Metastasierung		Gesamt	
		nein	ja		
OSNA- Ergebnis	(+)	Anzahl	16	1	17
		% innerhalb von OSNA-Ergebnis	94,1%	5,9%	100,0%
	(++)	Anzahl	12	10	22
		% innerhalb von OSNA-Ergebnis	54,5%	45,5%	100,0%
Gesamt		Anzahl	28	11	39
		% innerhalb von OSNA-Ergebnis	71,8%	28,2%	100,0%

*Tabelle 10 Kreuztabelle OSNA-Ergebnis Non-SLN Metastasierung:  
 $p=0,011$ ,  $OR:13,3$ , die Tabelle zeigt auch die Prozentwerte der Non-SLN-Metastasierung in Zusammenhang zu dem ermittelten OSNA-Ergebnis*

Zwischen der CK19 mRNA Kopienanzahl und der Axillametastasierung wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt. Bei 7900 oder mehr CK19 mRNA Kopien/ $\mu$ l wurde mit einer Sensitivität von 90,9% und einer Spezifität von 60% eine Axillametastasierung gefunden. (Youden-Index: 0,5162,  $p=0,015$ , siehe *Tabelle 11*)

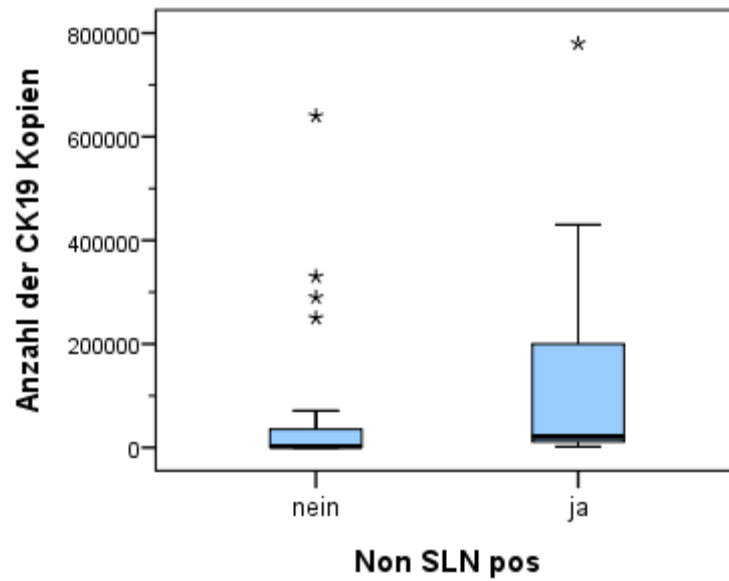


Abb. 6 (aus SPSS) Boxplot: Quantitative Verteilung der CK19-Kopienanzahl bei Non-SLN Positivität bzw. Negativität

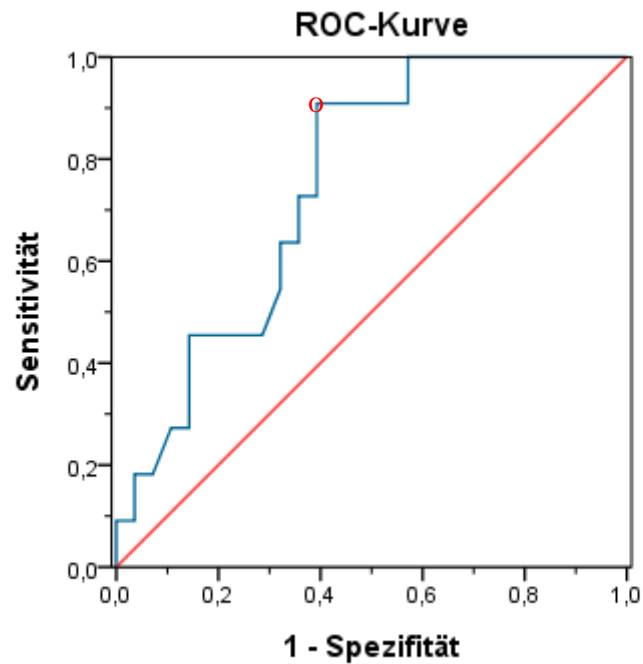


Abb. 7 ROC-Kurve, die gezeigte ROC-Kurve verdeutlicht das Ergebnis der Untersuchung. Aus den Koordinaten der Tabelle 11 ergibt sich hier ein signifikantes Ergebnis mit einer deutlichsten Trennschärfe bei einer Sensitivität von 0,90 und einer Spezifität von 0,60. Die „Area under the curve (AUC)“ beträgt 0,750 mit einem Youden-Index von 0,5162. Das Ergebnis der AUC liegt deutlich über dem Wert 0,5, sodass die Nullhypothese verworfen werden kann.

Positiv, wenn größer oder gleich <sup>a</sup>	Sensitivität	1-Spezifität	Spezifität	Youden-Index
249	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
260	1,0000	0,9643	0,0357	0,0357
290	1,0000	0,9286	0,0714	0,0714
315	1,0000	0,8929	0,1071	0,1071
375	1,0000	0,8571	0,1429	0,1429
455	1,0000	0,8214	0,1786	0,1786
550	1,0000	0,7500	0,2500	0,2500
860	1,0000	0,7143	0,2857	0,2857
1200	1,0000	0,6429	0,3571	0,3571
1350	1,0000	0,6071	0,3929	0,3929
1450	1,0000	0,5714	0,4286	0,4286
1600	0,9091	0,5714	0,4286	0,3377
1800	0,9091	0,5357	0,4643	0,3734
2050	0,9091	0,5000	0,5000	0,4091
2550	0,9091	0,4643	0,5357	0,4448
4350	0,9091	0,4286	0,5714	0,4805
<b>7900</b>	<b>0,9091</b>	<b>0,3929</b>	<b>0,6071</b>	<b>0,5162</b>
11000	0,7273	0,3929	0,6071	0,3344
12500	0,7273	0,3571	0,6429	0,3701
13500	0,6364	0,3571	0,6429	0,2792
16500	0,6364	0,3214	0,6786	0,3149
20000	0,5455	0,3214	0,6786	0,2240
22500	0,4545	0,2857	0,7143	0,1688
35500	0,4545	0,2500	0,7500	0,2045
52500	0,4545	0,2143	0,7857	0,2403
64500	0,4545	0,1786	0,8214	0,2760
90500	0,4545	0,1429	0,8571	0,3117
180000	0,2727	0,1429	0,8571	0,1299
270000	0,2727	0,1071	0,8929	0,1656
310000	0,1818	0,0714	0,9286	0,1104
380000	0,1818	0,0357	0,9643	0,1461
535000	0,0909	0,0357	0,9643	0,0552
710000	0,0909	0,0000	1,0000	0,0909
780001	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000

Tabelle 11 Koordinaten der ROC-Kurve: rot markiert ist der Cut-Off-Wert mit dem besten Youden-Index und somit der höchsten Trennschärfe, in Abb. 7 ROC-Kurve ist der Punkt nochmals rot markiert

Die unter Abb. 7 gezeigte ROC-Kurve berücksichtigt alle ermittelten Cut-Off-Werte bei der SLN-Diagnostik mittels OSNA (siehe auch Tabelle 11). Wie bei ROC-Analysen üblich wurde hier versucht einen Wert zu finden, bei dem möglichst maximale Werte für Sensitivität und Spezifität ermittelt werden konnten, um die Rate an falschen Ergebnissen minimal halten zu können.

### 3.2.3 Anzahl der positiven SLNs vs. Non- SLN Positivität

Die Anzahl der OSNA-positiven SLNs ist ein prädiktiver Wert für die Wahrscheinlichkeit einer Non-SLN Metastasierung. Mittels Chi-quadrat Test auf linearen Trend, exakt, konnte ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von 0,019 ermittelt werden.

		Non SLN-Metastasierung		Gesamt	
		nein	ja		
pos. SLN	1	Anzahl	20	4	24
		% innerhalb von pos. SLN	83,3%	16,7%	100,0%
	2	Anzahl	8	5	13
		% innerhalb von pos. SLN	61,5%	38,5%	100,0%
	>2	Anzahl	0	2	2
		% innerhalb von pos. SLN	,0%	100,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	28	11	39	
	% innerhalb von pos. SLN	71,8%	28,2%	100,0%	

*Tabelle 12 Kreuztabelle Anzahl der positiven SLN vs. Axillametastasierung:  $p=0,019$ , angegeben ist der jeweilige Prozentsatz der Patientinnen mit Axillametastasierung im Bezug auf die Anzahl der positiven SLN-Befunde*

### 3.2.4 Zusammenfassung der Korrelationen zwischen OSNA und den prognostischen Faktoren

[N (%)]	OSNA Ergebnis			P-Wert
	-	+	++	
	<b>102 (72.3)</b>	<b>17 (12.1)</b>	<b>22 (15.6)</b>	
<b>Tumourgröße</b>	≤ 2 cm	81 (75.7)	14 (13.1)	p <sup>(1)</sup> =0.038
	> 2 cm	21 (61.8)	3 (8.8)	
<b>Tumorart</b>	Invasiv-ductal	75 (74.3)	13 (12.9)	p <sup>(2)</sup> =0.604
	Invasiv-lobular	23 (65.7)	4 (11.4)	
	andere	4 (80.0)	0 (0.0)	
<b>Oestrogen-rezeptor-status</b>	neg	7 (70.0)	2 (20.0)	p <sup>(2)</sup> =0.750
	pos	95 (72.5)	15 (11.5)	
<b>Progesteron-rezeptor-status</b>	neg	18 (78.3)	2 (8.7)	p <sup>(2)</sup> =0.875
	pos	84 (71.2)	15 (12.7)	
<b>HER2/neu-status</b>	neg	97 (71.9)	17 (12.6)	p <sup>(2)</sup> >0.999
	pos	5 (83.3)	0 (0.0)	
<b>Vascular-invasion</b>	V0	101 (72.1)	17 (12.1)	p <sup>(2)</sup> >0.999
	V2	1 (100.0)	0 (0.0)	

(1)Chi-  
Quadrat-  
Test  
(2)Fisher-  
Test

*Tabelle 13: dargestellt sind die prognostischen Faktoren im Bezug auf das OSNA-Ergebnis mit den absoluten und prozentualen Häufigkeiten sowie den jeweiligen p-Werten*

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der angewandten Methoden

Alle angewandten Methoden zur Verifizierung der OSNA-Ergebnisse, sowie die SLN-Methodik selbst sind seit Jahren erprobte Verfahren zur Behandlung und zum korrekten Staging eines invasiven Mammakarzinoms. Sie werden alle von den geltenden Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. empfohlen [6].

Die mikroskopische Schnellschnittbegutachtung unter HE-Färbung und damit die im Falle von Positivität sofortige ALND werden seit Jahren am UKSH durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung nach CK19 wurde zur Verifizierung ausgewählt, da CK19 ein verlässlicher Tumormarker für ein invasives Mamma-CA ist [31] und die Färbung Mikrometastasen sowie einzelne Tumorzellen sichtbar machen kann. Die HE-Färbung gilt als Übersichtsfärbung zum Auffinden von Metastasen im Schnellschnitt, aber auch in der postoperativen genaueren Analyse eines SLN [35]. Das Konzept der SLN-Biopsie mit intraoperativer Begutachtung ist mittlerweile etabliert und wurde in verschiedenen Studien mit eindeutigen Ergebnissen bestätigt [13, 16, 17]. Die Bestimmung der SLN-Metastasierung ist eine valide Methode zur Entscheidungsfindung im Hinblick auf eine mögliche ALND [15, 36, 37]. Somit wurden ausschließlich etablierte Verfahren zur Überprüfung der OSNA-Ergebnisse und zum weiteren Staging mit der daraus folgenden Therapie verwendet.

Das Prinzip, auf dem OSNA basiert, wurde bereits in verschiedenen Studien überprüft und konnte ähnliche Ergebnisse, wie die Schnellschnittuntersuchung aufweisen. Jedoch waren die bisherigen Protokolle auf den reinen Vergleich zwischen den OSNA-Ergebnissen und der pathologischen Begutachtung ausgelegt. Es wurde stets das gleiche Studiendesign benutzt. Sie teilten den LN in vier Scheiben, von denen jeweils zwei mittels OSNA und zwei von einem Pathologen untersucht wurden. Dabei konnten Übereinstimmungsraten von 91,8-99,45% nachgewiesen werden. Die Angaben für Sensitivität und Spezifität reichten von 91,7-98,2% und 90,8-96,9% [26, 31, 38, 39].



Die hier dargestellte Studie geht nun einen Schritt weiter, indem sie die Entscheidung für die Durchführung einer ALND einzig auf das OSNA-Ergebnis stützt und nur eine Scheibe von 1mm Breite zur postoperativen pathologischen Aufarbeitung überlässt. Einzig die Arbeit von Osako et al. aus dem Jahre 2011 hat bei der SLN-Diagnostik auf eine pathologische Kontrolle verzichtet. Das Studiendesign verglich eine Kohorte von Patientinnen, deren SLN-Inspektion pathologisch erfolgte, mit einer Kohorte, die einzig mit OSNA untersucht wurde. Alleiniges Vergleichskriterium war, dass die Probanden der beiden Kohorten ein ähnliches Tumorstadium aufwiesen. Die Ergebnisse offenbarten, dass signifikant mehr SLN-Metastasen in der OSNA Kohorte gefunden wurden, was eine erhöhte Rate an ALND zur Folge hatte [40]. Jedoch zeigt eine andere Studie, dass OSNA die Rate an Zweitoperationen senkt und zudem eine eventuelle adjuvante Therapie früher initiiert wird [41].

Das angewandte Verfahren RT-LAMP kann eine Tumorzelle unter  $10^7$  normalen Zellen finden und ist somit 10-100 mal sensitiver als histologische Ergebnisse[42]. Die deutlich höhere Sensitivität molekularer Verfahren führt zu einer erhöhten Rate an positiven Ergebnissen bei Metastasensuche mittels molekularer Verfahren wie OSNA. Alle Studien, die Konkordanzraten überprüften [26, 31, 38, 39], teilen die LNs in vier Scheiben und haben diese dann mit unterschiedlichen Methoden untersucht, was bei kleineren Metastasen, die sich nicht über den kompletten LN verteilen (Tissue allocation bias) zu unterschiedlichen Ergebnissen führt und damit den Großteil der Diskordanzen erklärt. Jedoch traten auch immer wieder histologisch positive und OSNA negative Fälle auf, die sich nicht mit der „Tissue allocation bias“ erklären lassen. Dies kann verschieden Gründe haben.

In der Studie von Bernet et al aus dem Jahr 2011 [38] wurde ein falsch positiver SLN gefunden, in dem OSNA eine „cystische benigne epitheliale Inclusion“ als positiv deklarierte, was unter Routineumständen eine ALND nach sich gezogen hätte. Es wird hier erwähnt, dass diese Entität zwar unter histologischer Aufarbeitung aufgefallen wäre, aber auch extrem selten ist. Es demonstriert jedoch, wie wichtig es ist, den LN vor der Analyse von möglichst viel Gewebe epithelialen Ursprungs zu befreien, da auch gesundes Epithelgewebe (in deutlich geringerer Ausprägung) CK19 exprimiert [43]. Um falsch positive Ergebnisse aufgrund von nicht entfernten Epithelzellen im entfernten SLN auszuschließen, wurde die Cut-off Grenze von den Entwicklern des Essays so festgelegt, dass alle histologisch positiven SLNs die Grenze von  $2,5 \cdot 10^2$  Kopien/ $\mu$ l überschritten. Aber auch ein histologisch negativer SLN überschritt diese Grenze, was unter Routinebedingungen ein weiteres operatives Vorgehen nach sich gezogen hätte [31]. Dieses Beispiel zeigt, dass die statistisch anhand einer Normalverteilung festgelegten Cut-Off-Grenzen noch Raum für falsche Ergebnisse lassen und Zweifel bei der

molekularen Detektion von Metastasen angebracht sind. Jedoch gibt es auch bei pathologischer Begutachtung falsch negative Ergebnisse [44].

Die Studie von Le Frère-Belda et al. kam zu dem Ergebnis, dass eine Cut-off-Grenze von 380 Kopien/ $\mu$ l einen geringfügig besseren Youden-Index aufweist als die im Assay festgelegte (89,4% zu 89,2%) [45]. Die von Tsujimoto et al. festgelegte Cut-off-Grenze könnte somit zu niedrig gewählt worden sein. Dies führt dann unter der Verwendung in der klinischen Praxis zu einer erhöhten Rate an ALNDs. Die Entwickler des Assays legten jedoch ein großes Augenmerk darauf, falsch negative Ergebnisse zu vermeiden [31].

Laut Chu et al. exprimieren 98,2% aller Mamma-CAs CK19 [43], was einen kleinen Spielraum für falsch negative Ergebnisse lässt. Fraglich ist hier, ob das Problem durch präoperative Suche nach CK19-Expression im Biopsat des Primärtumors zu beheben wäre. Der Artikel von Vilardell et al. hält eine präoperative Diagnostik nach CK19 am Primärtumor für notwendig [46], während eine andere Studie zu dem Ergebnis kommt, dass kein Zusammenhang zwischen der CK19 mRNA Expression in Primärtumor und SLN besteht [47]. Bestätigen sich diese Ergebnisse, hätte die SLN-Diagnostik mittels OSNA stets ein gewisses Risiko für falsch negative Befunde.

Des Weiteren ist zu diskutieren, ob die Methode der ALND nach positiven SLN-Befund bei Tumoren bis 5cm in maximaler Ausdehnung noch den neusten Studienergebnissen entspricht. Die Studie von Guiliano et al. aus dem Jahre 2011 [24] konnte zeigen, dass im Hinblick auf die 5-Jahres-Überlebensrate sowie das krankheitsfreie Intervall kein Unterschied bestand zwischen den Patienten, die trotz positiven SLN nicht an der Axilla operiert wurden und denen, die äquivalent zu unserer Studie bei positiven SLN-Befund axilladissektiert wurden. Allerdings wurden in der Studie nur Patientinnen im frühen Erkrankungsstadium (pT1-pT2) untersucht, was eine Axillametastasierung unwahrscheinlicher macht [48]. Von der Studie ausgeschlossen waren alle Patientinnen, die präoperativ bereits Metastasen hatten, drei oder mehr positive SLNs-Befunde aufwiesen oder neoadjuvant therapiert wurden. Zudem gibt die Studie keine Auskunft über den Her2neu-Status und der Großteil der Patienten hatte positive Befunde in den Hormonrezeptoranalysen. Her2neu-Positivität ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [49]. Somit wurden bei Guiliano et al. ausschließlich Low-Risk-Patienten untersucht, die zudem alle chemotherapeutisch und brusterhaltend mit anschließender Radiotherapie behandelt wurden [24]. Systemische Therapien sowie die adjuvante Radiotherapie wirken auch auf eine eventuelle Axillametastasierung. Trotz allem gibt die erwähnte Studie Anlass, das bisherige Konzept der intraoperativen SLN-Diagnostik mit sofortiger ALND sowie die ALND im Allgemeinen zumindest bei Patientinnen im frühen Erkrankungsstadium zu überdenken.

Zudem gilt zu bedenken, dass es bei allen technischen Verfahren zu Mängeln kommen kann. So kam es in einer multizentrischen Studie zu technischen Fehlern bei der OSNA-Analyse [39], die, sollte der ganze LN homogenisiert worden sein, eine histologische Untersuchung zum Staging unmöglich machen. In diesen Fällen muss ein Alternativplan bestehen, um eine Zweitanalyse durchführen zu können [50].

Abschließend bleibt ein gewisser Raum für Ungewissheiten im Hinblick auf die derzeit durchgeführte Praxis der direkten ALND bei allen Patientinnen mit positiven SLN-Befund und der OSNA-Methode, da die erhöhte Sensitivität des Verfahrens zu einer erhöhten Rate an ALNDs führt, die prognostisch bei ansonsten guter Tumorbiologie und im Rahmen brusterhaltender Therapie mit anschließender Radatio nicht gerechtfertigt scheint.

## 4.2 Diskussion der statistischen Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studien, die die Konkordanzraten zwischen OSNA und der pathologischen Begutachtung untersucht haben [26, 31, 38, 39], zeigen eindeutig, dass OSNA der pathologischen Begutachtung des SLN ebenbürtig ist. Dass in dieser Arbeit 28 OSNA positive histologisch negative Fälle auftraten, war zu erwarten, da der Großteil des LN-Gewebes via OSNA analysiert wurde und nur eine 1mm breite Scheibe zur histologischen Aufarbeitung verwendet wurde. Die zwei Fälle von pathologisch positiven und OSNA negativen LNs sprechen für eine geringe Expression von CK19 in den LNs, was, wie bereits oben diskutiert, nach Chu et al. [43] in 1,2% der Fälle vorkommt.

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik ähneln den Angaben anderer Studien zum selbigen Thema. Beispielsweise lag das mediane Erkrankungsalter in der Studie von Godey et al. bei 56 Jahren [51] und bei Le Frère-Belda et al. bei 58 Jahren [45] im Vergleich zu unserem medianen Erkrankungsalter von ca. 60 Jahren. Bei Tamaki et al. [52] wurden im Schnitt 1,86 SLN pro Patient untersucht, während es bei uns im Schnitt 2,28 SLN waren. Auch konnte Tamaki das vorliegende Ergebnis bestätigen, dass bereits die OSNA-Einstufung nach (+) oder (++) einen statistischen Zusammenhang mit einer eventuellen Axillametastasierung aufweist [52]. Die hier ermittelte Rate an invasiv duktalem Karzinomen lag bei 70,6% und bei La Frère-Belda et al. bei 70,4%. Auch die Rate an invasiv lobulären Karzinomen war ähnlich. Somit entsprechen die hier berechneten Durchschnittswerte der Tumorcharakteristika sowie Patientendaten weitestgehend denen aus anderen Studien.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einzelne prognostische Faktoren mit dem OSNA-Ergebnis signifikant korrelieren und damit bereits Hinweise auf eine eventuelle SLN- sowie Axillametastasierung liefern können. Statistisch signifikant war, dass mit einem p-Wert von 0,039 ein Tumor >2 cm positiv mit der SLN-Metastasierung korrelierte. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Godey et al. [51]. Es spricht dafür, dass größere Tumore mehr Zeit zum einen für Wachstum, aber auch zur Metastasierung haben. Außerdem wurde festgestellt, dass die CK19 Zahl, die von OSNA in (+) und (++) eingeteilt wird, auf die Wahrscheinlichkeit einer Axillametastasierung schließen lässt (siehe auch [52]). Die Wahrscheinlichkeit hierfür war bei (++) im Vergleich zu (+) 13mal höher. Dies indiziert, dass die Tumorlast im SLN direkt mit der Tumorlast im nachgeschalteten Lymphdrainagesystem korreliert. Außerdem konnte ein Cut-off-Wert von 7900 mRNA Kopien/µl ermittelt werden, bei dem mit einer Sensitivität von 90,2% und einer Spezifität von 60% Axillametastasen vorlagen.

Dies ähnelt den Ergebnissen von Espinosa-Bravo et al., wobei die ermittelten statistischen Größen doch sehr von den hiesigen abweichen. Es ergab sich ein Cut-Off-Wert von 5000 mRNA Kopien/µl mit einer Sensitivität von 47% und einer Spezifität von 85% [53].

Die Studie von Ohi et al. ergab, dass eine mRNA Kopien-Anzahl von 5000 Kopien/µl ein signifikanter prognostischer Faktor im Hinblick auf vier LN-Metastasen ist (p-Wert: 0,014). Zudem wurde bestätigt, dass die Tumorgöße signifikant mit dem OSNA-Ergebnis zusammenhängt [54].

Aus diesen Korrelationen könnte sich ein neues Verfahren zur Entscheidungsfindung im Hinblick auf eine ALND etablieren, bei dem nicht die alleinige Tatsache, dass eine Metastase im SLN gefunden wurde, ausschlaggebend ist, sondern die Tumorlast im SLN. Dies würde einen Mittelweg darstellen zwischen der derzeit angewandten Routine einer ALND bei positivem Befund und der von Giuliano et al. angeregten vorsichtigeren Indikationsstellung für eine ALND [24]. Keine signifikante Korrelation konnte zwischen dem OSNA-Ergebnis und dem Her2neu-Status gefunden werden. Diese bestand aber in den Studien von Le Frère-Belda et al. und Godey et al. [45, 51]. Der Prozentsatz an Her2neu-positiven Befunden in der vorliegenden Studie lag mit 4,2% geringfügig unter dem der beiden anderen Studien mit 5,7% [51] bzw. 6,3% [45]. Außerdem war die Patientenzahl in der vorliegenden Studie deutlich geringer, was das Fehlen eines signifikanten Ergebnisses erklären kann.

Wie auch bei Ohi et al. [54] konnte gezeigt werden, dass das OSNA-Ergebnis in (+) und (++) eingeteilt wie auch die CK19 mRNA-Kopienanzahl statistisch signifikante Aussagen im Hinblick auf den Grad der Axillametastasierung und im Umkehrschluss auch auf die Größe des Primärtumors und somit das Tumorstadium zulassen.

Die Zeit für die SLN-Diagnostik mittels OSNA betrug bei einem SLN im Mittel 34,4 min und 40,4 min bei zwei SLN. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Studien [39, 55]. Bei Sagara et al. wird die Zeit bis zum OSNA-Ergebnis von im Mittel 36 min mit der Zeit bis zur Diagnose via Schnellschnitt von 22 min im Mittel verglichen [55]. Das Ergebnis deckt sich somit ungefähr mit den Erfahrungen am UKSH. Hier wird von einer Analysezeit von etwa 30 min durch den Pathologen ausgegangen.

Es lässt sich somit sagen, dass die pathologische Untersuchung OSNA im Faktor Zeit überlegen ist, was zu kürzeren Operations- und Narkosezeiten führt. Es besteht hier jedoch die Unsicherheit von etwa 3-5% [56] einer postoperativen Ergebnisdiskrepanz zwischen Schnellschnitt und der Aufarbeitung des kompletten LN, was wiederum zu einer Zweitoperation führt. Dieses Risiko besteht bei der Analyse mittels OSNA nicht.

Schlussendlich konnten klare statistische Zusammenhänge zwischen OSNA-Ergebnis und Metastasierungsgrad gefunden werden. Diese könnten in Zukunft eine wichtige Rolle in der praktischen Anwendung spielen. Bestätigen sich die hier dargelegten Ergebnisse in weiteren Studien mit höheren Fallzahlen könnte nach Absprache mit den Patienten auch bei SLN-Positivität mit einer unter einem bestimmten Cut-Off-Wert ermittelten Kopienzahl auf eine ALND verzichtet werden.

### 4.3 Ausblick

Im Kapitel Ausblick soll diskutiert werden, welche zukünftigen Chancen und Möglichkeiten sowie Vorteile für Patient und Gesundheitswesen in der OSNA-Methode liegen und wie man durch weitere Untersuchungen diese verifizieren kann.

Eine Kostenanalyse über die intraoperative SLN-Diagnostik durch ein molekulares Verfahren hat ergeben, dass sich die Kosten vermindern sowie das klinische Outcome der Patienten bei intraoperativer LN-Analyse verbessern lassen. Dies wird dadurch erklärt, dass das molekulare Verfahren den ganzen LN intraoperativ analysieren kann und dadurch die Rate an Zweitoperation zur ALND verringert wird. Jedoch wurden in dieser Studie die LNs nicht mittels OSNA sondern mit Hilfe von „GeneSearch BLN“ der Firma Veridex, New Jersey analysiert[57]. Dieses Verfahren wurde mittlerweile vom Markt genommen.

Eine Studie aus Spanien [58] hat sich mit einer Kosten-Nutzen-Analyse des OSNA-Verfahrens beschäftigt. Dabei wurden die Kosten einer Kohorte, die histologisch untersucht wurde, mit denen einer Kohorte, die via OSNA untersucht wurde, verglichen. Es ergab sich ein statistisch signifikantes ( $p\text{-Wert} < 0,005$ ) Kostenersparnis von 439,67€ in der OSNA-Kohorte. Allerdings muss angemerkt werden, dass die SLNs in der histologisch analysierten Kohorte nicht intraoperativ via Schnellschnitt analysiert wurden und deshalb bei Positivität des SLN eine Zweitoperation angesetzt werden musste. Somit lässt sich zumindest keine direkte Aussage über ein eventuelles Ersparnis in Deutschland treffen. Deshalb ist eine Kostenanalyse, die an die hiesigen Begebenheiten wie auch das System der „Diagnosis Related Groups“ angepasst ist, dringend erforderlich. Bei der Kostenabschätzung gilt auch zu bedenken, dass das OSNA-durchführende Personal, wie auch das Gerät selbst inklusive der Reagenzien einen hohen Kostenfaktor darstellen. Zudem ist der erhöhte Zeitbedarf der Methode mit einer längeren Operations- und Narkosezeit verbunden. Dies führt zu einer weiteren Anhebung der Kosten. Auf der anderen Seite dürfte durch den in Zukunft auftretenden Ärztemangel auch die Zahl der Pathologen sinken, sodass vielleicht bald allein deshalb die intraoperative aber auch die postoperative Diagnostik von apparativ molekularen Verfahren durchgeführt werden muss. Man kann in dieser Hinsicht OSNA auch zur Untersuchung der non-SLN nach ALND verwenden. Daraus resultiert aber laut Osaka et al. ein höheres Staging, weil mehr Mikrometastasen mittels molekularer Verfahren detektiert werden [59].

Außerdem muss nach den Ergebnissen von Guiliano et al. [24] diskutiert werden, ob auf eine ALND bei Low-Risk-Patienten verzichtet werden kann. Dies würde zu einer deutlichen Kostenreduktion führen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass zwischen Primärtumor und LN-Metastase Unterschiede im Hinblick auf Her2neu- und Östrogenrezeptorexpression bestehen [60-62]. Broom et al. geben die Diskordanz der Ergebnisse von Primärtumor und Metastase in Hinblick auf den Östrogenrezeptor mit 17,7% an [63]. Dadurch ergeben sich bei der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms neue Therapiekonzepte. Nach R0 Resektion muss sich eine systemische Therapie immer nach der Biologie der Metastase richten.

Das für OSNA hergestellte Lysat könnte in dem Zusammenhang für weitere prognostische Analysen oder im Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen untersucht werden. Somit müssten im Verlauf keine neuen Proben für molekulare Verfahren hergestellt werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ergibt sich aus den Erkenntnissen von Asari et al. Dabei hat sich gezeigt, dass auch bei präoperativ diagnostizierte Carcinomata in situ (CIS) eine SLN-Metastasierung vorliegen kann, was im Nachhinein eine höhere Tumorklassifikation nach

---

sich zieht [64]. Es ist darum sinnvoll bei CIS Patienten mit besonders ausgeprägten Befund ebenfalls einen SLN zu entfernen, um intraoperativ mittels OSNA nach möglichen Metastasen suchen zu können [52].

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass das OSNA-Ergebnis einen signifikanten Hinweis auf Tumorgröße und Axillametastasierung liefert und deshalb nicht nur als alleiniges diagnostisches Instrument zur Ermittlung von SLN-Metastasen geeignet ist. Im Hinblick auf gewisse Cut-off-Grenzen sollte weiter an einem höheren Patientenkollektiv untersucht werden, wie man einen validen Cut-off-Wert festlegen kann, der dem Operateur die Entscheidung zur ALND vereinfachen soll. Dieser müsste dann des Weiteren in einem prospektiven Setting an zwei Kohorten im Hinblick auf eventuelle Prognoseverbesserung durch ALND untersucht werden. Als Endpunkte der Studie müsste neben dem rezidivfreien Überleben auch das Gesamtüberleben untersucht werden, um auch den therapeutischen Nutzen einer ALND sicher feststellen zu können.

Jedenfalls stellen die Ergebnisse von Guiliano et al. das derzeit standardmäßig durchgeführte Procedere in Frage und es gilt zu untersuchen, ob die durch OSNA angegebene CK19-Kopienanzahl durch einen validen Cut-Off-Wert einen eleganten Zwischenweg ermöglichen könnte.

Die Möglichkeit der intraoperativen Feststellung der Tumorlast im LN stellt den großen Vorteil der Methode im Vergleich zur pathologischen Diagnostik dar.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Praktikabilität und die klinische Anwendbarkeit von OSNA (One-step Nucleic Acid Amplification) bei der intraoperativen Sentinellymphknotendiagnostik zu untersuchen.

Es wurden 330 SLN von 143 Patientinnen mit invasivem Mamma-CA intraoperativ analysiert. OSNA detektiert die CK19-Kopienanzahl/ $\mu$ l und teilt anhand derer das Ergebnis wie folgt ein: (-) negativ, (+) Mikrometastase und (++) Makrometastase.

Vor dem OSNA-Durchlauf wurde aus dem Zentrum des LN eine 1mm breite Probe zur postoperativen histologischen Untersuchung entnommen. Das restliche Gewebe wurde direkt mittels OSNA analysiert und im Falle von Positivität wurde eine Axilladisektion während der gleichen Narkose durchgeführt.

Außerdem wurden Korrelationen zwischen klinischen und prognostischen Tumorcharakteristika und dem OSNA-Ergebnis ermittelt und der Zeitbedarf der Methode analysiert.

39 der 143 Patientinnen hatten ein OSNA positives Ergebnis. Davon wiesen 22 Makro- und 17 Mikrometasen auf. Im Mittel wurden 34,4 min für die Untersuchung eines LN benötigt.

Zwischen Tumorgröße und OSNA-Positivität ( $p=0,038$ ) als auch zwischen der Tumorlast im SLN und der Wahrscheinlichkeit im Hinblick auf eine Axillametastasierung ( $p=0,011$ ) konnten signifikante Korrelationen gefunden werden. Zudem wurde ein Cut-Off-Wert von 7900Kopien/ $\mu$ l ermittelt, bei dem mit einer Sensitivität von 0,90 und einer Spezifität von 0,60 die Wahrscheinlichkeit für Non-SLN-Positivität bestimmt werden kann (Youden-Index: 0,5162).

Die vorliegende Studie zeigt, dass OSNA eine klinisch-praktikable Methode zur intraoperativen Diagnostik des SLN ist und im weiteren Verlauf auch die Entscheidungsfindung zur Axilladisektion erleichtern kann. Die Möglichkeit ganze LN in kurzer Zeit untersuchen zu können, kann die Arbeitsbelastung der Pathologen aber auch die Rate an Zweitoperationen senken. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Tumorlast im SLN mit der Wahrscheinlichkeit einer Axillametastasierung korreliert ( $p=0,015$ ).

Durch die mittlerweile übliche Planung der adjuvanten Therapie anhand des intrinsischen Subtyps muss der prognostische und therapeutische Stellenwert der ALND bei positiven SLN intensiver untersucht werden, um abschließend über die Bedeutung der SLN-Diagnostik mittels OSNA urteilen zu können.



## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb.1 Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung</i> .....	6
<i>Abb. 2 Prinzip der Fluoreszenz von Calcein während der Vervielfältigung mittels LAMP (Abbildung aus Tomita et al, 2008 [30])</i> .....	8
<i>Abb. 4 RD-100i, Quelle: <a href="http://www.sysmex.com.br/01-11-07.htm">www.sysmex.com.br/01-11-07.htm</a></i> .....	10
<i>Abb. 5 Cutter</i> .....	10
<i>Abb. 6 Lymphknotenaufarbeitung</i> .....	11
<i>Abb. 7 (aus SPSS) Boxplot: Quantitative Verteilung der CK19-Kopienanzahl bei Non-SLN Positivität bzw. Negativität</i> .....	22
<i>Abb. 8 ROC-Kurve, die gezeigte ROC-Kurve verdeutlicht das Ergebnis der Untersuchung. Aus den Koordinaten der Tabelle 11 ergibt sich hier ein signifikantes Ergebnis mit einer deutlichsten Trennschärfe bei einer Sensitivität von 0,90 und einer Spezifität von 0,60. Die „Area under the curve (AUC)“ beträgt 0,750 mit einem Youden-Index von 0,5162. Das Ergebnis der AUC liegt deutlich über dem Wert 0,5, sodass die Nullhypothese verworfen werden kann.</i> .....	22

### 6.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Patientenalter: Tabelle mit N, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Perzentilen</i> .....	14
<i>Tabelle 2 Menopausenstatus: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, .....</i>	14
<i>Tabelle 3 Tumorstadium [pT]: angegeben sind die .....</i>	15
<i>Tabelle 4 Tumorart: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente</i> .....	16
<i>Tabelle 5 Anzahl der mit OSNA analysiert LNs: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente</i> .....	17
<i>Tabelle 6 Endokrine Therapie: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente</i> .....	18
<i>Tabelle 7 Chemotherapie: angegeben sind die jeweiligen Häufigkeiten absolut und in Prozent, wie auch die kumulierten Prozente</i> .....	18
<i>Tabelle 8 Benötigte Zeit für die OSNA-Analyse: bei der Gesamtzahl der mittels der Methode analysierten LN; angegeben sind der zeitliche Spannbereich, der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient</i> .....	19
<i>Tabelle 9 Kreuztabelle OSNA-Ergebnis und Tumorgröße: <math>p=0,038</math>, angegeben ist der prozentuale Anteil der OSNA-Ergebnisse innerhalb der</i>	

---

jeweiligen Tumorgröße und die Prozentwerte der jeweiligen Tumorgröße innerhalb des OSNA-Ergebnisses. ....	20
<i>Tabelle 10 Kreuztabelle OSNA-Ergebnis Non-SLN Metastasierung: <math>p=0,011</math>, OR:13,3, die Tabelle zeigt auch die Prozentwerte der Non-SLN- Metastasierung in Zusammenhang zu dem ermittelten OSNA- Ergebnis .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 11 Koordinaten der ROC-Kurve: rot markiert ist der Cut-Off-Wert mit dem besten Youden-Index und somit der höchsten Trennschärfe, in Abb. 8 ROC-Kurve ist der Punkt nochmals rot markiert.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 12 Kreuztabelle Anzahl der positiven SLN vs. Axillametastasierung: <math>p=0,019</math>, angegeben ist der jeweilige Prozentsatz der Patientinnen mit Axillametastasierung im Bezug auf die Anzahl der positiven SLN-Befunde .....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 13: dargestellt sind die prognostischen Faktoren im Bezug auf das OSNA-Ergebnis mit den absoluten und prozentualen Häufigkeiten sowie den jeweiligen p-Werten .....</i>	<i>25</i>

### 6.3 Chemotherapieprotokolle:

#### 6.3.1 FEC

##### 5-Fluorouracil + Epirubicin + Cyclophosphamid

**Indikation:** adjuvante Chemotherapie bei Mamma- CA

**Dosierung:**

5-Fluorouracil	500mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag1
Epirubicin	100mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag1
Cyclophosphamid	500mg/m <sup>2</sup>	i.v.Tag1

**Begleitmedikation:** 125mg Aprepitant p.o.  
 1mg Granisetron + 8mg Dexamethason in 50ml NaCl 0,9%  
 MESNA 400mg i.v., falls Cyclophosphamid >1000mg  
 Ggf. Stomatitisprophylaxe empfehlen: Mundspülung mit Eiswasser -5 + 30min um 5-FU- Bolus

**Theapieintervall:** 21Tage, 6 Zyklen

**Notwendige Untersuchungen:** EKG/ Echo zu Therapiebeginn, im Verlauf nur bei klinischer Indikation, im Intervall 1\*wöchentlich Differential- Blutbild, Kreatinin, Billirubin, GPT/GOT, Urinstix

Zeitpunkt		Dauer
-60 min	125mg Aprepitant p.o. 500mg Jonosteril im Doppellauf	
-30 min	8mg Examethason + 1mg Granisetron in 50ml NaCl 0,9%	10 min.
0	Cyclophosphamid 500mg/m <sup>2</sup> in 500ml NaCl 0,9%	30- 60 min.
	Epirubicin 100 mg/m <sup>2</sup> i.v.	5- 15 min.
	5- Fluorouracil 500mg/m <sup>2</sup> i.v. Bolus	5 min.
+30- 60 min	gegebenenfalls MESNA 400 mg als Bolus	
+8 h	4 mg Dexamethason p.o.	
Tag 2 und 3:	80 mg Aprepitant p.o. 1*1 Dexamethason 2 * 4 mg p.o. Bei Bedarf zusätzlich 3 * 40 mg Metoclopramid p.o.	
Achtung: Applikation nur über zentralvenöses Portsystem oder ZVK		

### 6.3.2 FEC gefolgt von Docetaxel

5-Fluorouracil + Epirubicin + Cyclophosphamid gefolgt von Docetaxel

Indikation: adjuvante Therapie Mammakarzinom

Dosierung: 3 Zyklen

5-Fluorouracil	500mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1
Epirubicin	100mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1
Cyclophosphamid	500mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1

Gefolgt von 3 Zyklen

Docetaxel	100mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1
-----------	----------------------	------------

Begleitmedikation: FEC:

125mg Aprepitant p.o

1 mg Granisetron + 8 mg Dexamethason in 50 ml NaCl 0,9%

Dexamethason 4 mg p.o. abends

MESNA 400 mg i.v., falls Cyclophosphamid > 1000 mg

Ggf. Stomatitisprophylaxe empfehlen: Mundspülung mit Eiswasser –

55 bis + 30min um 5-FU- Bolus

Docetaxel:

Dexamethason 8 mg p.o. am Vorabend

1 mg Granisetron + 8 mg Dexamethason in 50 ml NaCl 0,9%

Dexamethason 8 mg p.o. abends

Therapieintervall: 21 Tage, 6 Zyklen

Notwendige Untersuchungen: EKG/Echo zu Therapiebeginn, im Verlauf nur bei klinischer Indikation, im Intervall 1 mal wöchentlich Differential-Blutbild, Kreatinin, Bilirubin, GPT/GOT, Urinstix

### 6.3.3 TAC

Docetaxel + Doxorubicin + Cyclophosphamid

Indikation: Neoadjuvante Therapie bei Mammakarzinom

Adjuvante Therapie bei nodal positiven Mammakarzinom

<u>Dosierung:</u>	Doxorubicin	50mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag1
	Cyclophosphamid	500mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1
	Docetaxel	75mg/m <sup>2</sup>	i.v. Tag 1

Begleitmedikation: 125 mg Aprepitant p.o.  
 1 mg Granisetron + 8 mg Dexamethason in 50ml NaCl 0,9%  
 4 mg Dexamethason p.o. abends  
 Mesna 400 mg i.v., falls Cyclophosphamid > 1000 mg  
 Pegfilgrastim 6 mg s.c Tag 2  
 Ciprofloxacin 2 \* 500 mg p.o. Tag 5 – 14

Therapieintervall: 21 Tage

Notwendige Untersuchungen: EKG/Echo, zu Therapiebeginn, im Verlauf nur bei klinischer Indikation, im Intervall wöchentlich Differential- Blutbild, Kreatinin, Bilirubin, GOT/GPT, Urinstix

Zeitpunkt		Dauer
-60 min	125mg Aprepitant p.o. 500mg Jonosteril im Doppellauf	
-30 min	8mg Examethason + 1mg Granisetron in 50ml NaCl 0,9%	10 min
0	Doxorubicin 50 mg/m <sup>2</sup> i.v.	5 – 15 min
+ 15 min.	Cyclophosphamid 500 mg/m <sup>2</sup> i.v.	30 – 60 min
+ 75 min.	Docetaxel 75 mg/m <sup>2</sup> i.v.	60 min.

Tag 2- 4: Aprepitant 80 mg p.o. 1\*1  
 Dexamethason 2\*4 mg p.o., an Tag 4, 4 mg morgens  
 Bei Bedarf zusätzlich 3 \* 40 mg Metoclopramid p.o.

Tag 2: Pegfilgrastim 6 mg s.c. (mindestens + 24h)

Tag 5- 14: Ciprofloxacin 2 \* 500 mg p.o.

## 6.4 TNM- Klassifikation

### T- Klassifikation:

TX	Primartumor kann nicht untersucht werden
T0	Kein Anhalt für Primartumor
Tis	Carcinoma in situ
Tis(DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobulares Carcinoma in situ
Tis (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser
T1a	größer 0,1 mm bis maximal 0,5 mm im größten Durchmesser
T1b	größer 0,5 mm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser
T1c	größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut
T4a	Befall der Thoraxwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel,
T4b	Ödem (einschließlich „peau d’orange“), Ulzeration der Haut oder Satellitenmetastasen der Haut
T4c	Vorliegen von T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom

### pN- Klassifikation

pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen

- 
- pN1 Mikrometastasen, Metastase bzw. Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/ oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen nachgewiesen durch Untersuchung des SLNs, aber nicht klinisch erkennbar.
- pN1mi Mikrometastase
- pN1a Metastase(n) in 1-3 axillären LNs, zumindest mit einer Makrometastase.
- pN1b Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des SLN, aber nicht klinisch erkennbar.
- pN1c Metastasen in 1-3 axillären LNs und LNs entlang der A. Mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n). nachgewiesen durch Untersuchung des SLNs, aber nicht klinisch erkennbar.
- pN2 Metastasen in 2-9 axillären LNs oder in klinisch erkennbaren LNs entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.
- pN2a Metastasen in 4-9 axillären LNs, zumindest eine Metastase mehr als 0,2cm in größter Ausdehnung
- pN2b Metastasen in klinisch erkennbaren LNs entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
- pN3 Metastasen wie nachfolgend beschrieben:
- pN3a Metastasen in 10 oder mehr ipsilateralen axillären LNs oder in ipsilateralen infraclaviculären LNs
- pN3b Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären LNs und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch SLN- Untersuchung, aber nicht klinisch erkennbar.
- pN3c Metastase(n) in ipsilateralen supraclaviculären LNs

#### M- Klassifikation

M0 keine Fernmetastase

M1 eine oder mehrere Fernmetastasen

## **7 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich zu allererst bei meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Christian Schem für das Bereitstellen der Thematik und seine tatkräftige Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Jonat möchte ich mich, für die Möglichkeit in seinem Institut promovieren zu dürfen, bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Micaela Mathiak und Frank Rösel für den ständigen Rat bei der Ausarbeitung der Thematik.

Zudem möchte ich mich bei Torsten Fleischhauer und Adrian Damm für die Unterstützung bei Anwendung der Software bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Marianne Witt, Tim Strohmaier, Volker Hofmann und Jonathan Hofmann für die Hilfe beim Korrigieren der Arbeit.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D., *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. *Krebs in Deutschland 2007/2008*.  
8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft  
der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
3. Mealiffe ME, Stokowski RP, Rhees BK, Prentice RL, Pettinger M, Hinds DA., *Assessment of clinical validity of a breast cancer risk model combining genetic and clinical information*. Journal of the National Cancer Institute, 2010. **102**(21): p. 1618-27.
4. Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK, *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(19): p. 323-30.
5. Cottet V, Touvier M, Fournier A, Touillaud MS, Lafay L, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, *Postmenopausal breast cancer risk and dietary patterns in the E3N-EPIC prospective cohort study*. American journal of epidemiology, 2009. **170**(10): p. 1257-67.
6. Kreienberg R, K.I., Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzl D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, von Minckwitz G, Naß-Griegoleit I, Posinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreier I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J und Zemmler T, *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2008.
7. Nothacker M, Duda V, Hahn M, Warm M, Degenhardt F, Madjar H, Weinbrenner S, Albert US, *Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review*. BMC Cancer, 2009. **9**(1): p. 335.
8. van Dongen JA, Voogd AC, Fentiman IS, Legrand C, Sylvester RJ, Tong D, van der Schueren E, Helle PA, van Zijl K, Bartelink H, *Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial*. Journal of the National Cancer Institute, 2000. **92**(14): p. 1143-50.
9. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1227-32.
10. Patrick L. Fitzgibbons, M.D.L.P., MD; Donald Weaver, MD; Ann D. Thor, MD; D. Craig Allred, MD; M.S.G.R. Gary M. Clark, MD; Frances O'Malley, MD; Jean F. Simpson, MD; James L. Connolly, MD; and M.S.B.E. Daniel F. Hayes, MD; Allen Lichter, MD; Stuart J. Schnitt, MD, *Prognostic Factors in Breast Cancer*. Arch Pathol Lab Med—Vol 124, July 2000, 1999.

11. Bembenek, A. and P.M. Schlag, *Lymph-node dissection in breast cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2000. **385**(4): p. 236-45.
12. Land SR, Kopec JA, Julian TB, Brown AM, Anderson SJ, Krag DN, Christian NJ, Costantino JP, Wolmark N, Ganz PA, *Patient-Reported Outcomes in Sentinel Node-Negative Adjuvant Breast Cancer Patients Receiving Sentinel-Node Biopsy or Axillary Dissection: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Phase III Protocol B-32*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(25): p. 3929-3936.
13. Kim, T., A.E. Giuliano, and G.H. Lyman, *Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma*. Cancer, 2006. **106**(1): p. 4-16.
14. Dabakuyo TS, Fraisse J, Causeret S, Gouy S, Padeano MM, Loustalot C, Cuisenier J, Sauzedde JM, Smail M, Combier JP, Chevillote P, Rosburger C, Boulet S, Arveux P, Bonnetain F., *A multicenter cohort study to compare quality of life in breast cancer patients according to sentinel lymph node biopsy or axillary lymph node dissection*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2009. **20**(8): p. 1352-61.
15. [www.sentinel-online.org](http://www.sentinel-online.org), K.-K.i.S.S., <history of sentinel.pdf>.
16. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrida S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R, *A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(6): p. 546-53.
17. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, Yiangou C, Horgan K, Bundred N, Monypenny I, England D, Sibbering M, Abdullah TI, Barr L, Chetty U, Sinnott DH, Fleissig A, Clarke D, Ell PJ, *Randomized Multicenter Trial of Sentinel Node Biopsy Versus Standard Axillary Treatment in Operable Breast Cancer: The ALMANAC Trial*. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(9): p. 599-609.
18. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference, *Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2007. **18**(7): p. 1133-44.
19. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R, *Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 343-53.
20. Fossati R, Confalonieri C, Torri V, Ghislandi E, Penna A, Pistotti V, Tinazzi A, Libe-rati A, *Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women*. J Clin Oncol, 1998. **16**(10): p. 3439-60.
21. Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J, *Trastuzumab in the Adjuvant Treatment of HER2-Positive Early Breast Cancer Patients: A Meta-Analysis of Published Randomized Controlled Trials*. PLoS ONE, 2011. **6**(6): p. e21030.
22. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
23. Gnant, M., N. Harbeck, and C. Thomssen, *St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion*. Breast Care, 2011. **6**(2): p. 136-141.
24. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M, *Axillary dissection vs no axillary*

- 
- dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial.* JAMA, 2011. **305**(6): p. 569-75.
25. Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M, Natoli G, Terzoli E, Cognetti F, Giannarelli D, *Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer.* Cancer, 2006. **106**(11): p. 2337-2344.
  26. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, Batic O, Jonat W, Tiemann K, *One-step nucleic acid amplification—a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group.* Virchows Archiv, 2008. **454**(2): p. 203-210.
  27. Hirsch, K., Iklé *Atlas der gynäkologischen Operationen.* Georg Thieme Verlag, 2009: p. 670-672.
  28. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, *Loop-mediated isothermal amplification of DNA.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(12): p. E63.
  29. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K, *Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 257-63.
  30. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T, *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products.* Nat Protoc, 2008. **3**(5): p. 877-82.
  31. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K, Tamaki Y, Noguchi S, Kataoka TR, Nakajima H, Komoike Y, Inaji H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakamura S, Daitoh M, Otomo Y, Matsuura N, *One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4807-16.
  32. Ruud, P., O. Fodstad, and E. Hovig, *Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells.* Int J Cancer, 1999. **80**(1): p. 119-25.
  33. Savtchenko ES, Schiff TA, Jiang CK, Freedberg IM, Blumenberg M, *Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence.* Am J Hum Genet, 1988. **43**(5): p. 630-7.
  34. Christian Wittekind, H.-J.M., *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010: p. 172-177.
  35. Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D, *A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance.* Cancer, 2005. **103**(3): p. 451-461.
  36. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Bussolati G, Boecker W, Borisch B, Connolly CE, Decker T, Dervan P, Drijkoningen M, Ellis IO, Elston CW, Eusebi V, Faverly D, Heikkila P, Holland R, Kerner H, Kulka J, Jacquemier J, Lacerda M, Martinez-Penuela J, De Miguel C, Peterse JL, Rank F, Regitnig P, Reiner A, Sapino A, Sigal-Zafrani B, Tanous AM, Thorstenson S, Zozaya E, Wells CA, *Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines.* Eur J Cancer, 2003. **39**(12): p. 1654-67.
  37. Viale G, Maiorano E, Prunerì G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, Zurrida S, Maisonneuve P, Paganelli G, Mazzarol G, *Predicting the Risk for Additional*

- 
- Axillary Metastases in Patients With Breast Carcinoma and Positive Sentinel Lymph Node Biopsy*. *Annals of Surgery*, 2005. **241**(2): p. 319-325.
38. Bernet L, Cano R, Martinez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, Palacios J, Rezola R, Robles-Frias M, Ruiz I, Velasco A, Vieites B, Sevilla F, Torro J, Medrano J, Ballesster B, *Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study*. *Histopathology*, 2011. **58**(6): p. 863-869.
  39. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sinnott HD, Nigar E, Singhal H, Chia Y, Cunnick G, Kissin MW, *Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma*. *British Journal of Surgery*, 2011. **98**(4): p. 527-535.
  40. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, Akiyama F., *Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer*. *Cancer*, 2011. **117**(19): p. 4365-4374.
  41. Klingler S, Marchal F, Rauch P, Kenouchi O, Chrétien AS, Genin P, Leroux A, Merlin JL, *Using one-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients avoids second surgery and accelerates initiation of adjuvant therapy*. *Annals of Oncology*, 2013.
  42. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, Mauldin PD, Palesch Y, Walters C, Urist MM, Mann GB, Doherty G, Herrmann VM, Hill AD, Eremin O, El-Sheemy M, Orr RK, Valle AA, Henderson MA, Dewitty RL, Sugg SL, Frykberg E, Yeh K, Bell RM, Metcalf JS, Elliott BM, Brothers T, Robison J, Mitas M, Cole DJ, *Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study*. *Ann Surg*, 2004. **239**(6): p. 828-37; discussion 837-40.
  43. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. *Histopathology*, 2002. **40**(5): p. 403-39.
  44. Barakat, F.H., I. Sulaiman, and M.A. Sughayer, *Reliability of frozen section in breast sentinel lymph node examination*. *Breast Cancer*, 2012.
  45. Le Frère-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, Peoc'h M, Seffert P, Bouteille C, Leroux A, Guillemain F, Blanc-Fournier C, Crouet H, Arnould L, Cuisenier J, Penault-Llorca F, Gimbergues P, Jacquemier J, Houvenaeghel G, Chatterlier G, Lécure F, *Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients*. *International Journal of Cancer*, 2011.**130**(10): p. 2377-86
  46. Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Díez-Castro MJ, Cuevas D, Panadés MJ, González S, Llombart A, Iglesias E, Matias-Guiu X, *Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA*. *Virchows Arch*, 2012. **460**(6): p. 569-75.
  47. Pegolo E, Puppini C, Gerometta A, Damante G, Puglisi F, Di Loreto C, *One-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative evaluation of sentinel lymph node status in breast cancer: a comparative study between CK19 protein expression and CK19 mRNA level in primary tumors and lymph node metastasis*. *Virchows Archiv*, 2013. **463**(1): p. 7-15.
  48. Yoshihara E, Smeets A, Laenen A, Reynders A, Soens J, Van Ongeval C, Moerman P, Paridaens R, Wildiers H, Neven P, Christiaens MR, *Predictors of axillary lymph node metastases in early breast cancer and their applicability in clinical practice*. *Breast*, 2012.

49. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW, *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 309-30.
50. Cserni, G., *Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification*. Journal of Clinical Pathology, 2011. **65**(3): p. 193-199.
51. Godey F, Leveque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, Lavoue V, Quillien V, Athias CB, *Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA)*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **131**(2): p. 509-516.
52. Tamaki Y, Sato N, Homma K, Takabatake D, Nishimura R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Tsuda H, Kinoshita T, Kato H, Taniyama K, Kamio T, Nakamura S, Akiyama F, Noguchi S, *Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients*. Cancer, 2012: p. n/a-n/a.
53. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, Rubio IT, Peg V, *Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay*. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2013. **39**(7): p. 766-773.
54. Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, Rai Y, Yotsumoto D, Matsukata A, Baba S, Tamada S, Matsuyama Y, Ando M, Sagara Y, Sasaki M, Tsuchimochi S, Tanimoto A, Sagara Y, *Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1239-43.
55. Sagara Y, Ohi Y, Matsukata A, Yotsumoto D, Baba S, Tamada S, Sagara Y, Matsuyama Y, Ando M, Rai Y, *Clinical application of the one-step nucleic acid amplification method to detect sentinel lymph node metastasis in breast cancer*. Breast Cancer, 2011.
56. Taffurelli M, Montroni I, Santini D, Fiacchi M, Zanotti S, Ugolini G, Serra M, Rosati G, *Effectiveness of sentinel lymph node intraoperative examination in 753 women with breast cancer: are we overtreating patients?* Ann Surg, 2012. **255**(5): p. 976-80.
57. Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, Gill J, Jeffrey MJ, Agrawal A, Wise M, Raftery J, Cree IA, Yiangou C, *Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis*. Journal of Clinical Pathology, 2010. **63**(6): p. 522-529.
58. Guillén-Paredes MP, Carrasco-González L, Cháves-Benito A, Campillo-Soto A, Carrillo A, Aguayo-Albasini JL, *El análisis molecular intraoperatorio (one-step nucleic acid amplification) del ganglio centinela como alternativa al estudio histopatológico diferido en el cáncer de mama: análisis coste-beneficio*. Cirugía Española, 2011. **89**(7): p. 456-462.
59. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Akiyama F, *Accurate staging of axillary lymph nodes from breast cancer patients using a novel molecular method*. British Journal of Cancer, 2011. **105**(8): p. 1197-1202.
60. Zidan J, Dashkovsky I, Stayerman C, Basher W, Cozacov C, Hadary A, *Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease*. Br J Cancer, 2005. **93**(5): p. 552-6.
61. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G, *HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 999-1004.

- 
62. Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, Laenkholm AV, *ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **132**(2): p. 511-521.
  63. Broom RJ, Tang PA, Simmons C, Bordeleau L, Mulligan AM, O'Malley FP, Miller N, Andrulis IL, Brenner DM, Clemons MJ, *Changes in estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2/neu status with time: discordance rates between primary and metastatic breast cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(5): p. 1557-62.
  64. Ansari B, Ogston SA, Purdie CA, Adamson DJ, Brown DC, Thompson AM, *Meta-analysis of sentinel node biopsy in ductal carcinoma in situ of the breast*. British Journal of Surgery, 2008. **95**(5): p. 547-554.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Jakob Hofmann  
Geburtsdatum: 17.08.1985  
Geburtsort: Alsfeld  
Anschrift: Hansastr.7, 24118 Kiel  
Telefonnummer: 0176/70568045  
E-Mail: jakob.hof@web.de  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

08/1992-07/1996 Grundschole Feldatal  
08/1996-07/2002 Stiftsschule St. Johann Amöneburg  
08/2002-07/2005 Theo-Koch-Schule Grünberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/2006-03/2007 Geologiestudium an der Universität Mainz  
04/2007-03/2009 Vorklinisches Medizinstudium an der Universität Gießen  
Abschluss: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/2009-04/2013 Klinisches Medizinstudium an der Universität Kiel  
Abschluss: Staatsexamen  
seit 02/2010 Doktorarbeit an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UKSH Kiel

### Publikationen

- J Cancer Res Clin Oncol. 2013 Aug 2,  
*Intra-operative use of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for detection of the tumor load of sentinel lymph nodes in breast cancer patients.*  
Heilmann T, Mathiak M, Hofmann J, Mundhenke C, van Mackelenbergh M, Alkatout I, Wengers A, Eckmann-Scholz C, Schem C.